



# Revue Francophone des Laboratoires



**Volume 2016, Issue 481,  
Pages 3-94  
(April 2016)**

 [LEMONDEDESPHARMACIENS](http://www.lemondepharmaciens.com)

 [LEMONDEDESPHARMACIENS](https://www.facebook.com/lemondepharmaciens)

 [#LemondedesPharm](https://twitter.com/LemondedesPharm)

Elsevier Masson SAS  
Société par actions simplifiées  
à associé unique  
au capital de 47 275 384 €  
RCS Nanterre B 542 037 031  
62, rue Camille-Desmoulins  
92130 Issy-les-Moulineaux



Tél./Fax: 01 71 16... + les 4 chiffres  
de votre correspondant  
<http://www.elsevier-masson.fr>

**PRÉSIDENT ET DIRECTEUR DE LA PUBLICATION :**  
Daniel Rodriguez

**DIRECTRICE DES REVUES PROFESSIONNELLES**  
Yasmina Ouharzoune  
[y.ouharzoune@elsevier.com](mailto:y.ouharzoune@elsevier.com)

**RÉDACTRICE EN CHEF :**  
Martine Tirouche  
[m.tirouche@elsevier.com](mailto:m.tirouche@elsevier.com)

**CONSULTANT SCIENTIFIQUE DE LA RÉDACTION :**  
Claude Naudin  
[clinaudin@numericable.fr](mailto:clinaudin@numericable.fr)

**COLLABORATEURS DE LA RÉDACTION :**  
Revue de presse :  
Joël Gozlan, Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès,  
Vincent Maréchal, Michel Segondy  
Actualités — Santé publique — Veille juridique :  
Jean-Marie Manus

**FAX-RÉDACTION :** 01 71 16 51 59

**MARKETING – RESPONSABLE DE MARCHÉ :**  
Sonia Tadjdet (58 60)  
[s.tadjdet@elsevier.com](mailto:s.tadjdet@elsevier.com)

**PUBLICITÉ – DIRECTEUR DES VENTES :**  
Jean-Marie Pinson (53 10)  
Mobile: 06 15 72 16 73  
[j.pinson@elsevier.com](mailto:j.pinson@elsevier.com)

**SERVICE ABONNEMENTS :**

Tél. : 01 71 16 55 99 – Fax : 01 71 16 55 77  
<http://www.em-consulte.com/infos>

**PAO :** humancom, 48 rue de Dantzig, 75015 Paris.  
**IMPRESSION :**  
Lescure Théol, 27 Douains.

Copyright© 2016 — Elsevier Masson SAS — Tous droits réservés. Cette publication et son contenu sont protégés par le copyright de Elsevier Masson SAS, et les dispositions suivantes s'appliquent à son utilisation : Les simples photocopies d'articles isolés sont autorisées pour un usage privé, dans la mesure où les lois nationales relatives au copyright le permettent. L'autorisation de l'éditeur et le paiement de redevances est obligatoire pour toutes les autres photocopies, y compris les copies multiples ou systématiques, les copies effectuées à des fins promotionnelles ou de publicité, la revente et toute autre forme de distribution de documents. Des tarifs spéciaux sont disponibles pour les institutions d'enseignement qui souhaitent faire des photocopies à des fins non commerciales d'enseignement. Les personnes peuvent obtenir les autorisations nécessaires et payer les redevances correspondantes auprès du Centre Français d'Exploitation du Droit de la Copie (20, rue des Grands-Augustins, F – 75006 Paris). Les abonnés sont autorisés à effectuer des copies des tables des matières, ou établir des listes d'articles comprenant des extraits pour un usage interne à l'intérieur de leurs institutions. L'autorisation de l'éditeur est requise pour toute revente ou divulgation en dehors de l'institution. L'autorisation de l'éditeur est requise pour tous autres travaux dérivés, y compris les compilations et les traductions. L'autorisation de l'éditeur est requise pour saisir de façon électronique tout élément contenu dans la présente publication, y compris tout ou partie d'un article. Prière de prendre contact avec l'éditeur à son adresse indiquée ci-dessus. À l'exception de ce qui est indiqué ci-dessus, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite, saisie dans un système de sauvegarde, ou transmise sous quelque forme que ce soit, électronique, mécanique, par photocopie, enregistrement ou autre, sans l'autorisation préalable et écrite de l'éditeur. La responsabilité de l'éditeur ne saurait en aucune façon être engagée pour tout préjudice et/ou dommage aux personnes et aux biens, que cela résulte de la responsabilité du fait des produits, d'une négligence ou autre, ou de l'utilisation de tous produits, méthodes, instructions ou idées contenus dans la présente publication. En raison de l'évolution rapide des sciences médicales, l'éditeur recommande qu'une vérification extérieure intervienne pour les diagnostics et la posologie.

CPPAP 0117 T 81120 – ISSN 1773-035x  
Dépôt légal : à parution

**Couverture**

© EYE OF SCIENCE/PHANIE

**Index des annonceurs**

|                  |                         |
|------------------|-------------------------|
| Biorad           | 4 <sup>e</sup> de couv. |
| Elsevier Masson  | 4 - 7 - 24 - 48 - 76    |
| Elitech          | 15                      |
| Fumouze          | 13                      |
| Meridian         | 17                      |
| Reed Exhibitions | 2 <sup>e</sup> de couv  |

# édito

## Assistance à la fin de vie : la loi, enfin...

Après le classique aller-retour entre Assemblée et Sénat, la refonte de la loi sur la fin de vie (loi Leonetti, 2005) est (enfin) parue au JO du 2 février<sup>1</sup>, apportant modifications, ajouts et précisions sur les conditions de prise en charge des personnes en phase avancée ou terminale d'une maladie incurable, en créant de nouveaux droits pour les personnes en fin de vie.

La loi introduit la sédation profonde continue jusqu'au décès -sous analgésie [la fin de vie doit se passer sans douleur] jusqu'à l'arrêt des traitements de maintien en vie- mise en œuvre à la demande de patients atteints d'une affection grave et incurable engageant à court terme le pronostic vital. Cette sédation répondra à une souffrance réfractaire aux traitements, ou à un patient décidant d'arrêter un traitement avec le risque d'endurer une souffrance extrême. On pourra recourir également à la sédation chez un patient n'ayant plus la capacité d'exprimer sa volonté, si l'équipe médicale, selon une procédure collégiale, décide d'arrêter le traitement de maintien en vie pour éviter l'acharnement thérapeutique [que d'autres nomment *obstination thérapeutique*].

Deux autres points-clés figurent à la loi, les directives anticipées et la personne de confiance.

Les directives anticipées s'imposeront au médecin, sauf en cas d'urgence vitale ou si elles paraissent inappropriées ou non conformes à la situation médicale. Le refus éventuel de les appliquer sera décidé, là encore, selon une procédure collégiale.

Cette décision sera inscrite au dossier médical et la personne de confiance désignée par le patient ou, à défaut, sa famille ou ses proches, en seront informés. En l'absence de directives anticipées, le médecin consultera la personne de confiance ou à défaut un membre de la famille ou un proche si le patient est hors d'état d'exprimer sa volonté, afin de connaître son souhait relatif à sa fin de vie. Un décret précisera les conditions de rédaction des directives anticipées et d'information du patient sur celles-ci. Rappel : tout sujet majeur peut rédiger ces directives anticipées pour exprimer ses volontés pour sa fin de vie

RFL

1. <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/loi/2016/2/2/AFSX1507642L/jo/texte>

## Conseil scientifique

**PRÉSIDENT :** Paul LAFARGUE (Paris).

**BUREAU :** Bruno BAUDIN (Paris), Dominique CHABASSE (Angers), Alain CHEVAILLER (Angers), Éric GARNOTEL (Marseille), Michèle IMBERT (Créteil), Marie-Laure JOLY-GUILLOU (Angers), Marc MAYNADIÉ (Dijon), Michel SEGONDY (Montpellier).

**COMITÉ :**

**MEMBRES FRANÇAIS :** Frédéric BARBUT (Paris), Patrice BOURÉE (Le Kremlin-Bicêtre), René CHERMETTE (Maisons-Alfort), Claude GUIGUEN (Rennes), Paul HOFMAN (Nice), François JEHL (Strasbourg), Saïd KAMEL (Amiens), Marie-Nathalie KOLOPP-SARDA (Lyon), Jean-Jacques LATAILLADE (Clamart), Jean-Philippe LAVIGNE (Nîmes), Jérôme LE GOFF (Paris), Michèle MALET (Caen), Vincent MARÉCHAL (Paris), Denis MASSIGNON (Lyon), Thierry MOLINA (Paris).

**MEMBRES ÉTRANGERS :** Smail BELAZZOUG (Algérie), Ahcène DEMBRI (Algérie), Hicham OUAZZANI (Maroc), Lassaad SARRAI (Tunisie), Abderrahim TAZI (Maroc).

**MEMBRES HONORAIRES :** Marie-Hélène BESSIÈRES (Toulouse), Jean-Louis KOECK (Bordeaux), Anne-Marie MANEL (Champagne-au-Mont-d'Or), Jean-Claude NICOLAS (Chatou/Princeton, USA), Michel VAUBOURDOLLE (Paris).

*Abusus non tollit usum*

## Prestations de conseil (10)

### Une thrombopénie sévère, particulière et rare sous héparinothérapie

*Cette femme, âgée de 45 ans est porteuse d'une obésité morbide (IMC 40 kg/m<sup>2</sup>) pour laquelle elle a bénéficié d'une réduction chirurgicale de l'estomac par by-pass. Une injection unique de Calciparine a été pratiquée à dose préventive, le bilan pré-opératoire étant normal (dont les plaquettes à 270 G/L).*

*À J 2, apparaissent une fièvre à 39 °C, une douleur abdominale avec vomissements, une hypotension systolique à 88 mm Hg, une oligurie (0,45 mL/kg/h), une hémiparésie gauche et au plan biologique une CRP à 100 mg/L et un TP à 60 %. La patiente est ré-hospitalisée et un scanner abdominal révèle une thrombose des artères mésentériques et rénales. Une bi-antibiothérapie et de la Calciparine à dose curative sont prescrites.*

*À J 5, les plaquettes sont à 60 G/L et le biologiste interrogé suspecte une TIH; des examens complémentaires (Ac anti-PF4, test d'agrégation) sont transmis à un laboratoire spécialisé; le biologiste conseille au prescripteur l'arrêt de la calciparine et sa substitution par du Danaparoïde sodique (surtout pas de relai par AVK – voir discussion).*

*À J 7, la thrombopénie s'accroît (30 G/L) justifiant la transfusion de plusieurs concentrés plaquettaire; l'hémo-gramme révèle une Hb à 105 g/L, un VGM à 86 fL et une CCMH à 33,3 g/dL et des schizocytes.*

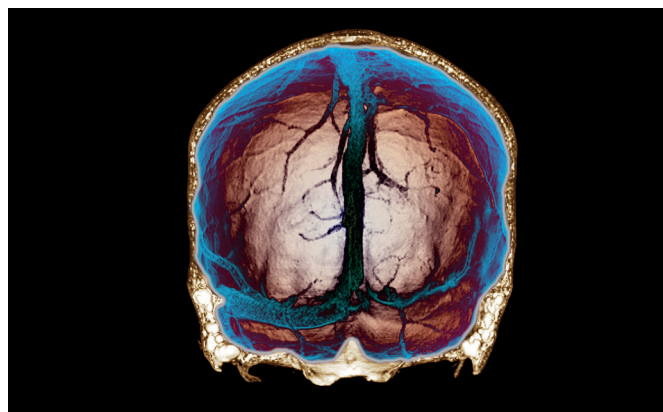
*À J 9, face à une nouvelle transfusion plaquettaire non efficace (plaquettes à 18 G/L), à la baisse de l'hémoglobine (70 g/L) et une créatininémie à 150 µmol/L, le dossier est revu en réunion collégiale car les résultats des deux examens complémentaires précédents sont négatifs. Voir discussion.*

*À J 11, suite à l'aggravation du déficit neurologique, l'angiographie révèle une thrombophlébite cérébrale.*

## Discussion

De la réunion multidisciplinaire, et du retour des différents résultats de biologie, il ressort que les hypothèses diagnostiques suivantes sont écartées :

- La pseudo thrombopénie artéfactuelle (EDTA) : absence d'agrégats vérifiée sur frottis et numération en prélèvement capillaire (Unopette) et contrôle en tube citraté,
- La thrombopénie allo-immune : aucune transfusion de CPA ou CPS antérieure n'est notée,
- La thrombopénie d'origine centrale : aucune anomalie de la lignée blanche, aucune pan-cytopenie n'a été observée à l'hémo-gramme et la thrombopénie est survenue de façon brutale et isolée. De plus, le résultat du dosage de la Vit B12 est normal.
- Les thrombopénies allergique, auto immune ou virale : des traitements par thiazidiques, pénicilline et digoxine connus pour être responsables de thrombopénies concernent cette patiente, mais aucune prise n'a eu lieu dans les 8 jours précédents.



ZEPHYR/SPL/PHANIE

Il n'a pas été relevé par ailleurs de purpura qui permettrait de discuter un PTI. Même si la formule leucocytaire et l'âge de la patiente ne plaident pas en faveur d'une thrombopénie d'origine virale, le biologiste conseille la réalisation, de principe, des sérologies VHB VHC, CMV et EBV, qui reviendront négatives.

- La thrombopénie par CVID en liaison avec un sepsis : le dosage confirmé du fibrinogène à 4 g/L, la PCT à 0,4 mg/L, un taux de DDIM < à la valeur seuil et une série d'hémocultures négatives ne sont pas en accord avec les signes cliniques (fièvre, oligurie, insuffisance rénale aiguë post intervention chirurgicale et CRP à 100 mg/L).
- La thrombopénie induite par l'héparine de type I (**voir encadré 1**), dont l'incidence (10 à 30 % pour les héparines non fractionnées), très supérieure à celle de type II est de survenue précoce (< 5 j après l'injection), reste modérée (autour de 100 G/L) et n'induit pas de thrombose. Ces 3 critères ne sont pas retrouvés chez cette patiente.

#### Encadré 1

### Thrombopénies sous héparine

#### TIH Type I

D'installation rapide (< 4 j), elle est due à l'activation directe de la fonction plaquettaire par l'héparine proagrégante; le taux de plaquettes est > à 100 G/L. La correction est spontanée et ne nécessite pas d'interruption du traitement.

#### TIH Type II

##### Définition

La TIH II immuno-allergique se définit par une baisse du taux de plaquettes supérieure à 30 % ou une thrombopénie inférieure à 100 G/L de survenue brutale entre le 5<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> jour (délai de 4 à 5 jours pour la synthèse des anticorps IgG anti-facteur 4 plaquettaire).

Ce délai peut être ramené à 24-48 h si un traitement héparinique antérieur (100j) est noté (pré-sensibilisation).

Elle survient dans 1 à 5 % des traitements par héparine non fractionnée et dans 0,1 à 0,2 % en cas d'héparine de bas poids moléculaire.

## Encadré 2

## La TIH type II

## Mécanisme

Les Ac IgG anti PF4-Héparine se lient au récepteur Fc $\gamma$ /CD32 avec activation plaquettaire et coagulation, formation de complexes macro-moléculaires (CIC), libération dans le sérum avec activation du complément. Les cellules endothéliales sont également activées via les glycosaminoglycanes (GAGs). Les plaquettes recouvertes d'anticorps vont

être phagocytées par les macrophages, entraînant une thrombopénie. Mais ces plaquettes activées vont également libérer du facteur 4 plaquettaire (auto-entretien du processus de TIH) et des micro-particules pro-coagulantes. Le risque de CVID est très important.

## Signes cliniques

– thromboses mésentérique, surrénalienne, cérébrale,

– détresse respiratoire,  
– nécroses cutanées au point d'injection.

## Évaluation de l'imputabilité

– délai de la chute plaquettaire,  
– absence d'autre cause potentielle de thrombopénie,  
– élimination d'une pseudo-thrombopénie (agrégats en EDTA-vérification sur Unopette ou citrate, satellitisme).

- La thrombopénie induite par l'héparine de type II (voir encadrés 2 et 3) est sévère (< 100 G/L), plus tardive que la TIH I (après le 7<sup>e</sup> jour, sauf en cas de pré-sensibilisation, ce qui est le cas de cette patiente). Son score 4T (voir encadré 4) étant de 7 impose l'arrêt immédiat de l'héparinothérapie et la substitution par un anticoagulant non héparinique. Les AVK sont à proscrire, car en phase thrombopénique aiguë, une thrombose micro-vasculaire avec nécrose ischémique est possible (gangrène veineuse).

## Encadré 3

## TIH II : Diagnostic biologique spécialisé

## Les tests fonctionnels :

Principe : détection d'un facteur plasmatique chez le patient capable d'activer les plaquettes de sujets témoins en présence d'héparine.

– La technique agrégométrique (TAP) : incubation du plasma suspect en présence d'héparine avec les plaquettes de plusieurs donneurs témoins.

La spécificité est supérieure à 90 %.

– Le test de libération de la sérotonine radiomarquée (test de référence).

## Les tests immunologiques (ELISA) :

Mise en évidence et quantification, en phase solide, des anticorps anti-Facteur 4 Plaquettaire/héparine : *Heparin Platelet Induced Antibodies* (HPIA).

Critères du « score 4T » (Warkentin T.E)  
(non validé en réanimation)

| Critère               | Observation                                                                                       | Score |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Thrombopénie          | > 50 % ou $\geq$ 20 G/L                                                                           | 2     |
|                       | > 30 < 50 % ou < 20 G/L                                                                           | 1     |
|                       | < 30 % ou < 10 G/L                                                                                | 0     |
|                       |                                                                                                   |       |
| Survenue              | Entre 5 et 10 j ou < 24 h si sensibilisation Héparine < 30 j                                      | 2     |
|                       | > 10 j ou $\leq$ 24 h si sensibilisation < 31 et 100 j                                            | 1     |
|                       | Aucun de ces cas                                                                                  | 0     |
|                       |                                                                                                   |       |
| Clinique (Thromboses) | Nouvelle thrombose prouvée ou nécrose cutanée ou réaction systémique après bolus IV HNF           | 2     |
|                       | Récidive ou Extension de thrombose ou suspicion de thrombose ou érythème cutané au pt d'injection | 1     |
|                       | Aucun événement thrombotique.                                                                     | 0     |
|                       |                                                                                                   |       |
| Autre cause           | Aucune autre cause évidente de thrombopénie.                                                      | 2     |
|                       | Autre cause possible.                                                                             | 1     |
|                       | Autre cause certaine de thrombopénie.                                                             | 0     |
|                       |                                                                                                   |       |

## Probabilité pré-test de la TIH type II

|               |       |
|---------------|-------|
| Élevée        | 6 à 8 |
| Intermédiaire | 4 à 5 |
| Faible        | 0 à 3 |



### Abusus non tollit usum

#### Encadré 5

#### Microangiopathie thrombotique (MAT)

Les microangiopathies thrombotiques (MAT) sont définies par l'association d'une anémie hémolytique mécanique et d'une thrombopénie périphérique. Elles sont secondaires à la formation de thrombi au sein de la microcirculation, le plus souvent cérébrale et rénale.

Une lésion endothéliale est la cause initiale (pré-disposition génétique: déficit en pro-

téase ADAMTS 13 du vWF ou présence acquise d'Ac anti- ADAMTS 13).

#### Diagnostic biologique de la MAT

- Anémie hémolytique intravasculaire mécanique  
Hb < 12 g/dL, LDH élevée, Haptoglobine indosable, Schizocytes >2%
- Thrombopénie

- TP, TCA et Fibrine « normaux » (absence de CIVD)

- Coagulation intravasculaire localisée:
  - au niveau du rein: Syndrome Hémolytique et Urémique « S.H.U. » (enfant)
  - au niveau cérébral: Purpura Thrombotique Thrombotique « P.T.T. » (adulte)

Mais les tests complémentaires (Ac anti-PF4, agrégation plaquettaire) étant négatifs ce diagnostic de TIH type II n'est pas retenu *a posteriori*.

La thrombopénie (absence de remontée du taux de plaquettes 48 h après l'arrêt de la Calciparine) liée à une hémolyse mécanique (baisse de Hb à partir de J 7, haptoglobine indosable, schizocytes+, Coombs direct négatif) s'ajoutent à la défaillance d'organe (insuffisance rénale aiguë) et à l'aggravation de la thrombopénie sous transfusions plaquettaires. Le diagnostic de microangiopathie thrombotique dont il existe deux formes principales, le PTT et le SHU (*voir encadrés 5,6 et 7*) est posé.

L'activité déficiente du facteur ADAMTS 13 du fait de la présence d'Ac circulants anti-ADAMTS 13 confirmera ce diagnostic.

Une fois le diagnostic de PTT établi, le biologiste propose comme il se doit la recherche d'une cause sous-jacente et demande une sérologie VIH.

Le résultat est positif et confirmé...

**« Aut viam inveniam aut faciam »**

**attribué à Hannibal**

**(« Je trouverai le chemin ou je le percerai »).**

**Enfin c'est juste notre avis.**

**Fabrice Guerber**

**fabrice.guerber@oriade.fr**

**Claude Naudin**

**cnaudin@numericable.fr**

#### Rappel

**En cas de TIH type II confirmée, une déclaration doit être faite au centre de pharmacovigilance régional et un certificat médical doit être établi et donné au patient pour éviter toute réintroduction d'héparine.**

#### Encadré 6

#### Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT) ou Syndrome de Moscowitz

Atteinte auto-immune (ac anti-ADAMTS13) responsable d'un défaut de clivage du facteur Willebrand d'où la formation de thrombi dans la microvascularisation.

Les anticorps antinucléaires sont souvent associés à un déficit acquis en ADAMTS13.

Les échanges plasmatiques (EP) sont le seul traitement reconnu comme efficace.

La sérologie VIH est systématique chez l'adulte (MAT révélatrice de l'infection).

#### Encadré 7

#### Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU)

D'incidence maximale chez les enfants de moins de 3 ans, le SHU est lié à une contamination alimentaire par (le plus souvent) un *Escherichia coli* entéro-hémorragique (O157: H7).

La vérotoxine (shiga like toxin) passe dans le sang et altère les cellules endothéliales qui relarguent des multimères de facteur Willebrand à partir des corps de Weibel Palade.

La nécrose épithéliale tubulaire est associée à la présence importante des récepteurs de la vérotoxine à la surface des cellules endothéliales rénales et des cellules tubulaires.

D'autres formes de SHU, atypiques, sont liées à un défaut de régulation de la voie alterne du complément (mutations).

Penser également au SHU lié à une infection à *Streptococcus pneumoniae* et à *Shigella dysenteriae* type 1 (retour de voyage en Asie ou Afrique).



© StockPhotoPro

## Essais cliniques : faut-il changer les règles ?

**La Commission des affaires sociales du Sénat organisera des auditions sur les garanties qu'a prévues la législation pour la sécurité des volontaires se prêtant aux essais cliniques lors de l'étude de phase 1 d'un nouveau candidat-médicament.**

Ceci après l'accident survenu en décembre lors de l'essai initial d'une molécule (candidat-médicament), organisé par un laboratoire d'essais thérapeutiques agréé (Biotrial, Rennes). À la suite de ce drame [1 décès, 5 personnes intoxiquées sorties de l'hôpital avec séquelles cérébrales], la Commission sénatoriale approuve la décision de contrôles de l'Inspection générale des affaires sociales (IGAS) et de l'Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé (ANSM), dont elle entendra les acteurs après leur inspection : elle jugera alors s'il y a nécessité de faire évoluer la législation des essais thérapeutiques. Rappel : par deux fois, la commission a dénoncé, lors de l'examen annuel de l'application des lois, l'absence de décret permettant de rendre applicables les dispositions de la loi du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine (loi Jardé). C'est un texte, rappelle le Sénat, adopté à une large majorité par les deux assemblées, qui offre un cadre pour le développement de la recherche clinique, tout en améliorant la protection des sujets participant aux essais. Le décret, attendu depuis bientôt 4 ans, doit conforter le fonctionnement des Comités de protection des personnes (CPP), chargés de valider les protocoles d'essais. Les textes adoptés au niveau européen et les discussions en cours ne doivent pas nous exonérer d'une réflexion sur les éventuelles

faiblesses de la législation et les moyens d'y remédier, disent les sénateurs.

Au lendemain des accidents, le laboratoire pharmaceutique portugais Bial, promoteur de l'essai clinique [les essais précliniques avaient été réalisés ailleurs], a publié un communiqué évoquant notamment la nouvelle molécule, un inhibiteur de l'enzyme cérébrale FAAH (*fatty acid amid hydrolase*), dont les essais ont débuté en juin 2015. L'apparition de symptômes sévères chez 6 des volontaires a justifié leur admission en urgence au CHU de Rennes. Une collaboration s'est établie entre les responsables portugais, arrivés sur les lieux, et les neuro-urgentistes du CHU de Rennes.

La nouvelle molécule (nom de code BA10-2474) était testée selon les règles internationales de bonnes pratiques cliniques (BPC) appliquées aux essais chez l'Homme, notamment toxicologiques. Le résultat des essais précliniques avait permis d'envisager le début des essais cliniques chez l'humain, rappelle Bial, confiés à Biotrial, une CRO (*contract research organization*), comme c'est la règle des essais cliniques dans le monde.

Le nouveau médicament, en inhibant la FAAH, elle-même inhibitrice de neuromédiateurs du système endocannabinoïde cérébral, aurait, selon Bial, des applications en neurologie et en psychiatrie (dépression et douleur ?). Le protocole d'essais a été approuvé par les autorités sanitaires françaises et le Comité d'éthique.

Les suppositions parues dans les médias [incidents aux essais précliniques, excès de doses administrées aux essais cliniques...] n'ont aucune valeur : on attend les résultats de l'enquête pharmaco-juridique autorisée. ■■

J.-M. M.

## BRÈVES

### Setmelanotide, médicament orphelin pour le Prader-Willi

Pour les sujets atteints du pénible syndrome de Prader-Willi, l'octroi du statut de médicament orphelin au setmelanotide (RM-493, Laboratoire Rhythm) est une bonne nouvelle, car ce médicament dans une classe thérapeutique assez pauvre (agoniste de la voie du MC4R/melanocortin-4 receptor) apporterait enfin une solution à la prévention du développement de l'obésité d'origine génétique qui est une des caractéristiques de ce syndrome, marqué aussi par une hyperphagie incontrôlable, et dû à un déficit sur la voie de la MC4, une voie-clé chez l'Homme qui régule la dépense énergétique et l'appétit, et à un déficit en opio-mélanocortine. C'est un syndrome à risque léthal. Une étude clinique de phase 2 est en cours. L'attribution du statut de médicament orphelin se justifie par la rareté du syndrome (maladie rare... et non pas *orpheline*) mais aussi par sa gravité, et les résultats de l'étude en cours sont attendus au cours du premier semestre de 2016. D'autres médicaments-orphelins sont en examen à la FDA.



© burntime555

### Anti-androgènes et risque de diabète

Les hommes traités pour cancer de prostate traités par anti-androgènes ont plus de probabilité de développer un diabète que les hommes traités par un autre moyen, selon la méta-analyse d'une équipe chinoise (Huimin Wang et coll., *Nankai Clinical School, Tianjin Medical University*). Les auteurs ont analysé les données de 8 études menées en 2014, qui ont compté au total 157 588 patients porteurs d'un cancer de la prostate, recevant soit divers traitements de suppression androgénique (*androgen deprivation therapy*/ADT n = 65 695), soit constituant le groupe contrôle non traité (91 893). Seules ont été retenues les études qui s'intéressaient au statut diabétique des patients. Chez les patients ADT, 7 136 ont développé un diabète (environ 10,9 %) et 6 987 du groupe non ADT (environ 7,6 %). Constat : l'incidence du diabète est de 39 % supérieure dans le groupe ADT (RR = 1,39 ; 95 % IC 1,27-1,53). Le diabète était significativement associé avec l'ADT de 6 mois ou plus, légèrement moins avec le traitement court.



© highwaystaz

Source : Wang H, *J Diabetes Invest*. 2015 ; doi : 10.1111/jdi.12472.

## BRÈVES



© torwaiphot

### Anesthésie et pré-Alzheimer: pas de rapport

Chez l'adulte d'âge moyen (après 40 ans), l'anesthésie générale pour intervention chirurgicale n'est pas un facteur de risque de déficit cognitif léger (*mild cognitive impairment*) plus tard dans la vie, selon une étude publiée les *Mayo Clinic Proceedings* (Rochester). L'équipe des anesthésistes de la Mayo Clinic a analysé les données de 1 731 sujets de 70 à 89 ans, qui avaient des fonctions cognitives normales au début de l'étude en 2004. Environ 85 % de ces sujets ont eu au moins une chirurgie requérant une anesthésie générale après 40 ans. Ils étaient évalués régulièrement. Chez les sujets de l'étude, 31 % ont développé un *mild cognitive impairment*, qui n'était pas associé à l'anesthésie, selon les auteurs. Qui concluent qu'il n'y a pas de lien entre anesthésie générale au cours de la vie et l'apparition de ce signe parfois considéré comme un pré-Alzheimer.

Source: Sprung Juraj, et al. *Association of Mild Cognitive Impairment With Exposure to General Anesthesia for Surgical and Nonsurgical Procedures*. *Mayo Clin Proc*. 2016; doi: 10.1016/j.mayocp.2015.10.023.

### Baisse de la couverture vaccinale du nourrisson au premier semestre 2015



© vchalup

La couverture vaccinale du nourrisson pour la primo-vaccination contre la diphtérie, le tétanos, la coqueluche, la poliomyélite et la méningite à *Haemophilus influenzae*, effectuée avec des vaccins combinés qui peuvent également inclure l'hépatite B, est très élevée en France depuis de nombreuses années: autour de 98 %, selon l'InVS. La couverture vaccinale avec le vaccin Prevenar® dépasse maintenant 90 %. Cependant, entre les premiers semestres 2014 et 2015, l'InVS a observé une diminution du nombre de doses de ces vaccins remboursés chez les enfants de moins de 9 mois, il estime donc que la baisse de l'activité de vaccination du nourrisson serait proche de 5 %. Le fait que cette diminution concerne les vaccins combinés mais également le vaccin Prevenar® pour lequel il n'y a pas eu de difficultés d'approvisionnement en 2015, plaide en faveur de l'hypothèse d'une augmentation accrue de l'hésitation vaccinale. Ceci est préoccupant, dit l'InVS.



© Tsuboya

## Ministère de la Santé contre vaccinocritiques

**Ce ministère annonce un ambitieux Plan d'action pour la rénovation de la politique vaccinale, d'après le rapport ad hoc de l'ex-députée Sandrine Hurel. C'est selon ses recommandations (accessibles sur le site du ministère) un plan en 4 points, pour agir auprès des particuliers, des professionnels de santé et des industriels, pour renforcer la confiance dans la vaccination - vaste programme, aurait dit le Général.**

- *Meilleure information du public et des professionnels de santé.* Sont prévus: un bulletin trimestriel pour les professionnels de santé; un Comité des parties prenantes (sic), sous l'égide de la DGS, composé de professionnels de santé, d'associations d'usagers et d'institutions, pour mieux comprendre les réticences à la vaccination et anticiper les crises [crise aiguë de confiance-NDLR]; carnet de vaccinations électronique pour améliorer le suivi du statut vaccinal des patients; Agence nationale de santé publique (ANSP) donnant accès à une information validée.

- *Meilleure gouvernance de la politique vaccinale (sic).* Soit d'une part, sous l'égide de la DGS, échanges réguliers entre le ministère, l'ANSM et l'Office national d'indemnisation des accidents médicaux (ONIAM) pour améliorer les connaissances des effets indésirables des vaccins; d'autre part rattachement du Comité technique des vaccinations (CTV) à la HAS pour unifier l'expertise et en renforcer l'indépendance [le CTV est une cible des antivaccinalistes-NDLR]; enfin soutien à la recherche sur les vaccins et la sécurité de leur

production, en lien avec le ministère de la Recherche.

- *Sécuriser l'approvisionnement en vaccins, lutter contre les tensions d'approvisionnement et les pénuries.* Soit en termes simples rupture de stocks, phénomène qui n'est pas propre à la France (même les USA connaissent ces *shortages*!). Il y aura obligation pour les producteurs de vaccins de mettre en place un plan de gestion des pénuries, des stocks réservés au territoire national, des chaînes alternatives de fabrication de vaccins et une identification des sources d'approvisionnement en principes actifs; obligations assorties de sanctions, mesure prévue au projet de loi de modernisation du système de santé, dit le ministère. L'autorisation d'importation de vaccins sera simplifiée en cas de pénurie de vaccins.

- *Lancer une grande concertation citoyenne pour débattre sur la vaccination.* Elle sera organisée tout au long de 2016 par un Comité d'orientation présidé par un spécialiste éminent personnalité, le Pr Alain Fischer, expert en immunologie pédiatrique, professeur au Collège de France. Pour ce débat national sont prévus: en mars une plateforme web recueillant les contributions du public, des professionnels, des associations et des institutions; en mai des jurys de citoyens, de professionnels de santé et d'experts pour analyser ces contributions en n'écartant aucune question de fond; en octobre un débat public national pour analyser les avis des jurys et les contributions du public.

Cela permettra-t-il au Comité d'orientation de formuler enfin en décembre des conclusions qui mettraient fin au vaccinocriticisme? ■■

J.-M. M.



# Risque cardiovasculaire: et si on s'occupait des femmes?

**La Direction générale de la santé (DGS), l'Institut de veille sanitaire (InVS) et l'Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (INPES) organisaient le 10 mars un colloque sur le thème des maladies cardiovasculaires chez les femmes et de leur prévention: *Les femmes au cœur du risque cardiovasculaire*.**

Selon les organisateurs, depuis une dizaine d'années, les taux d'hospitalisation des femmes de moins de 65 ans pour maladies cardiovasculaires, et en particulier pour infarctus du myocarde, sont en croissance régulière. Ceci oblige à porter un regard nouveau sur le fait *souvent mal connu* que les maladies cardiovasculaires restent la première cause de mortalité des femmes. Des causes multiples sont évoquées pour expliquer cette progression préoccupante: évolution des comportements individuels et des facteurs de risque depuis plusieurs décennies (tabagisme, surpoids et obésité,

sédentarité...), dans un contexte de profonde évolution sociétale des conditions de vie des femmes.

De plus, la méconnaissance du risque cardiovasculaire et de *symptômes parfois atypiques* peut amener à sous-estimer leur gravité et conduire à un retard diagnostique et thérapeutique [une tendance contre laquelle luttent les autorités nord-américaines depuis des années, bien avant la France-NDLR]. Une stratégie de prévention est évidemment possible tout au long de la vie, par la sensibilisation des femmes et la mobilisation spécifique des professionnels de santé.

Cette journée de sensibilisation, destinée à l'ensemble des acteurs de santé et de la prévention et, à travers eux, au grand public, a souhaité le ministère, avait pour objectifs de faire un état des lieux de la santé cardiovasculaire des femmes autour des signes d'alarme et de leurs principaux déterminants, notamment comportementaux, et de mettre en exergue les stratégies de prévention adaptée aux femmes, tout en soulignant les particularités de la prise en

charge des femmes, et en incitant l'ensemble des acteurs à s'emparer de l'enjeu de la prévention cardiovasculaire des femmes. Parmi ces acteurs: les journalistes spécialisés qui, dès 1993, ont entendu les mises en garde de la Fédération française de cardiologie (FFC) contre une idée reçue de l'époque: grâce à ses hormones, la femme est protégée contre le risque cardiovasculaire (par rapport à l'homme). Présidente à l'époque de la FFC, le Pr Mireille Brochier (CHU de Tours) lança la campagne d'information «*Nous sommes protégées, sachons le rester*», pour inciter les femmes à observer les mêmes mesures de prévention que les hommes.

Le colloque proposé par la DGS, l'InVS et l'INPES montre que le message mérite d'être répété aux jeunes générations de femmes... et de professionnels de santé. La situation est la même aux USA, où des *mouvements cardio-féministes* ont pris à leur tour le problème en main... et à cœur. ■■

**J.-M. M.**



## BRÈVES



© Evgenia Tiplashina

### Bactéries : comment se répliquer à tout prix

Lors de la division, l'ADN des cellules peut être lésé, mais un système de réparation peut reconstituer un génome complet, en dupliquant l'ADN endommagé grâce à des enzymes spécifiques ou par d'autres mécanismes de sauvegarde du patrimoine génétique utilisant l'information du deuxième brin. Une équipe du Centre de recherche en cancérologie de Marseille (CNRS/Inserm/Aix-Marseille Université, Institut Paoli-Calmettes) montre que si ce mécanisme échoue, la cellule bactérienne peut se diviser malgré la présence d'une brèche de son génome. La cellule-fille qui hérite de l'ADN endommagé ne survivra pas, mais l'autre pourra se répliquer. Ces chercheurs veulent déterminer si ce mécanisme existe aussi dans les cellules de type eucaryotes, telle la cellule humaine, pour comprendre par exemple pour quelle raison les cellules cancéreuses prolifèrent... sans être réparées.

Source: *Bacterial proliferation: keep dividing and don't mind the gap.* Luisa Laureti, Julien Demol, Robert P. Fuchs, Vincent Pagès, *Plos Genetics*, 29/12/2015. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005757.

### Un traitement pour le déficit en Facteur X

Coagadex® (BioProducts Laboratory) est un concentré de Facteur X humain de haute pureté, premier facteur de coagulation spécifique destiné aux patients porteurs d'un déficit héréditaire en Facteur X. Ce facteur protéique est un activateur d'enzymes participant à la cascade de la coagulation physiologique. Le déficit congénital en ce facteur est responsable d'anomalies de la coagulation. Habituellement, les sujets porteurs de ce déficit sont traités par des injections de plasma frais ou par un concentré de complexe prothrombinique dérivé du plasma pour stopper ou prévenir des saignements. La FDA a approuvé Coagadex®, considérant qu'il constitue une avancée significative pour traiter cette maladie rare mais grave. Extrait du plasma, il est prescrit aux patients à partir de 12 ans, soit à la demande, soit pour maîtriser les épisodes de saignements, soit comme protection péri-opératoire. Une étude chez 16 sujets à risque (208 épisodes de saignement au total) a apporté les éléments justifiant l'approbation de la FDA.



© alphaspirit

## IDIV : inquiétude derrière les chiffres ?

### Le Syndicat de l'industrie du diagnostic *in vitro* (SIDIV) a publié l'édition 2015 de sa brochure institutionnelle sur les chiffres-clés de l'IDIV.

Cela commence sur un constat positif : notre industrie est solidement ancrée sur le territoire national et représente un secteur-clé pour la santé, l'économie et l'innovation en France. Soit 12 000 emplois directs, dont 46 % en R&D et production, 33 % d'entreprises productrices et 3 milliards d'euros à l'exportation. Elle apporte des innovations à l'exercice de la biologie médicale, des autotests et des TROD. Elle contribue à plus de 70 % des décisions prises par les cliniciens.

Mais le SIDIV tempère : les entreprises sont confrontées à un constat alarmant. Elles sont les victimes indirectes de la régulation économique des actes de biologie médicale et des produits de santé, une sorte de variable d'ajustement, l'obsession de faire des économies sur la santé...

Ainsi en 2014, pour la troisième année consécutive, l'IDIV française « est en souffrance ». Le chiffre d'affaires du secteur (auprès des LBM publics et privés, > 90 % de ses parts de marché) est en recul : il a perdu 30 millions d'euros entre 2011 et 2014, et malheureusement, les analyses tendancielles du SIDIV prévoient une amplification de ce phénomène en 2015. L'explication ? Pour les industriels, les entreprises évoluent dans un environnement réglementaire draconien en pleine mutation. L'arrivée prochaine du nouveau règlement européen va exiger des efforts d'adaptation considérables dont l'impact pourrait coûter 2 milliards d'euros à l'IDIV

européenne, dont 300 millions d'euros pour les seuls producteurs français.

Les IDIV doivent donc faire face à une dégradation notable de leur situation économique, qui impacte leurs budgets de R & D, leur capacité d'innovation, les investissements en moyens de production, l'attractivité du territoire national et *in fine* les patients.

Afin d'approfondir ces éléments, le SIDIV publie dans sa brochure annuelle les chiffres-clés de cette industrie de santé. Par exemple, dit-il, le chiffre d'affaires des IDIV pour l'autosurveillance glycémique, malgré la forte augmentation de la prévalence du diabète, était encore inférieur en 2014 à celui de 2013. Il existe une augmentation du volume des actes de biologie, due essentiellement à l'augmentation de la population et à son vieillissement, à l'origine d'une évolution rapide des maladies chroniques [et de leur surveillance biologique] : ce volume augmente d'un peu plus de 4 % par an en moyenne depuis 2010. L'une des mesures pare-feu (ONDAM) des pouvoirs publics a consisté régulièrement à réajuster (à la baisse) le taux de remboursement des ABM les plus prescrits et la lettre-clé des actes. Secteur public et secteur privé se voient imposer des mesures d'économies drastiques, comme disent les médias, peu au fait de ce qu'est la biologie médicale pour la santé humaine...

Bref, un constat morose. À suivre, sur la RFL. ■■

J.-M. M.

Source: SIDIV [www.sidiv.fr](http://www.sidiv.fr)

## Arthrite récente : penser Lyme ?

**Une maladie de Lyme doit être envisagée par les rhumatologues chez des patients signalant l'apparition récente d'arthrites, même en l'absence des symptômes évocateurs la suggérant. Des rhumatologues français ont entrepris une étude multicentrique pour déterminer l'impact du diagnostic sérologique de routine d'une maladie de Lyme chez des patients avec arthrite récente touchant au moins 2 articulations.**

L'étude (cohorte ESPOIR) regroupait 810 patients chez lesquels l'arthrite était apparue entre 6 semaines et 6 mois au moment de la prise en charge. L'étude coordonnée s'est déroulée dans 14 centres de rhumatologie de dix régions de France chez des patients enrôlés entre décembre 2002 et mars 2005. Les patients enrôlés n'avaient aucun antécédent de traitement, soit par des DMARD (*disease-modifying anti-rheumatic drugs*), soit par des corticoïdes. La pathologie articulaire a été évaluée à l'entrée puis tous les six mois pendant deux ans et une fois par an pendant 10 ans en clinique rhumatologie. Outre l'examen clinique, les patients ont subi une NFS, une évaluation de la fonction rénale, une sérologie virale, une analyse d'urine, ainsi que le dosage d'IgM, d'IgA et d'IgG, de cytokines, des peptides citrullinés et d'anticorps antinucléaires. Des radiographies ont été effectuées du thorax, du bassin, des mains et des pieds.

En 2006 la recherche d'anticorps (IgG et IgM) anti-*Borrelia burgdorferi* (spirochète dont la tique Ixodes est le vecteur) par un test en ELISA a été effectuée sur la quasi-totalité des patients enrôlés. Le test Western blot de confirmation n'a pas été utilisé.

Selon les résultats rapportés par les auteurs, 81,1 % des patients étaient négatifs à la fois pour les IgM et les IgG, tandis que 11,2 % des patients n'avaient que des IgM et 6 % seulement des IgG et 1,6 % avaient IgM et IgG. Chez seulement 7,2 % des patients la maladie de Lyme n'a pu être exclue.

À deux ans de suivi, ces données sérologiques étaient inchangées et aucun patient n'a pu recevoir un diagnostic définitif de Lyme.

En conclusion, cette étude n'est pas en faveur d'une sérologie Lyme de routine chez des patients ayant une arthrite inflammatoire d'apparition récente et d'origine diverse : (poly)arthrite rhumatoïde, syndrome de Sjögren, arthrite virale, spondylarthrite, arthrose inflammatoire, LED, notamment lorsqu'il n'y a pas d'antécédent rapporté de morsure de tique ou d'érythème migrant chronique. ■■

J.-M. M.

Source : D. Guellec (CHU Cavale Blanche, Brest) et coll. RMD Open. 2015 ; doi : 10.1136/rmdopen-2015-000120.  
<http://rmdopen.bmj.com/>, 20/1/2016.

## BRÈVES

### Musique amplifiée chez les 15-35ans: ouïe en danger



© von Lieres

L'exposition à des niveaux sonores intenses et répétés de musique amplifiée est l'une des causes des troubles de l'audition. Selon le Baromètre Santé 2014, parmi 4859 jeunes de 15-35ans interrogés, 13 % ont un usage fréquent et intense avec des écouteurs. Cette pratique concerne plus souvent les hommes, les habitants

des grandes agglomérations et les plus jeunes, elle décroît avec l'avancée en âge. Par ailleurs, 21 % des interrogés fréquentent concerts, discothèques ou autres lieux ayant un volume sonore élevé. Il s'agit le plus souvent de sujets masculins de 20 à 24 ans, financièrement aisés et habitant une grande agglomération. Si la fréquentation des lieux de loisirs à volume sonore élevé est en diminution depuis 2007, la part des 18-35ans ayant un usage fréquent et intense d'écoute de musique amplifiée avec écouteurs est passée de 4 % à 13 %. D'où nécessité d'une prévention pour préserver l'audition des adolescents et des jeunes adultes.

Source: Christophe Léon et coll., Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (INPES).

### Acide urique, moins de Parkinson?



© fotolaxrender

Chez l'homme (et non la femme), le risque de maladie de Parkinson semble moindre si les urates sériques sont élevés, selon l'étude d'une équipe de l'Université de Pennsylvanie impliquant les 90 214 sujets de 3 études de cohorte en cours, pour analyser

le rapport entre taux d'urates sériques et risque de maladie de Parkinson. Un total de 388 cas de Parkinson (202 hommes, 186 femmes) a été apparié à 1 267 contrôles. Les auteurs ont évalué le risque relatif en tenant compte de variables: âge, tabagisme, consommation de café, cholestérol, ferritine. Les auteurs ont constaté, en se basant sur les différentes concentrations d'urates, que le risque relatif de Parkinson était de 0,63 (Intervalle de confiance [IC] à 95 %: 0,53-1,10) chez les hommes et de 1,04 IC 95 %: 0,61-1,78 chez les femmes, soit au total 0,63 vs 0,89 respectivement. Les urates seraient protecteurs contre la maladie de Parkinson ou retarderaient sa progression.

Source: Xiang Gao et coll. Prospective study of plasma urate and risk of Parkinson disease in men and women. *Neurology*. 2016; doi: 10.1212/WNL.0000000000002351.



© bakhtiarzein

## Virus Zika: expansion sans frontières

**Le ministère de la Santé a confirmé dès le début 2016 l'identification, en Guyane, en Guadeloupe et en Martinique, des premiers cas d'infection à virus Zika et indiqué que les ARS de Guyane, de Martinique et de Guadeloupe sont mobilisées pour surveiller et limiter la dissémination du virus et prendre en charge les personnes contaminées par ce virus émergent.**

Le 2 février, l'OMS déclarait « urgence de santé publique de préoccupation internationale » (*public health emergency of international concern*) l'épidémie à virus Zika devant l'incidence des cas de microcéphalie néonatale et de complications neurologiques.

Enfin est confirmée la transmission du virus à l'occasion de relations sexuelles, la présence du virus dans le sperme ayant été pour la première fois signalée par l'équipe de l'Institut Louis-Malardé de Papeete (Tahiti) lors de l'épidémie polynésienne de 2013 (D. Musso et coll.).

Le virus Zika (famille des *Flaviridae* comme le virus de la dengue) est transmis à l'Homme par un moustique du genre *Aedes*, tel *Aedes aegypti*. Les mesures individuelles de protection contre les piqûres de moustique sont donc indispensables pour écarter le risque épidémique. Point important: contrairement au vecteur du paludisme, *Aedes* a une activité principalement diurne. C'est donc aussi dans la journée qu'il faut se protéger. On recommande de ce fait le port de vêtements couvrants, l'usage de produits répulsifs et la protection par une moustiquaire des enfants au berceau et en poussette. Les conseils de prévention s'adressent aussi bien aux populations autochtones qu'aux personnes, tels les touristes, devant se rendre dans les régions à risque, par exemple lors des vacances scolaires.

Les mesures de protection individuelle visent à prévenir la dissémination du virus. Il est notamment recommandé de détruire les gîtes potentiels de reproduction des moustiques (réceptacles d'eau stagnante) et les larves autour des habitations, comme on le recommande contre le vecteur du chikungunya et de la dengue en métropole.

Le virus Zika sévit principalement dans l'ensemble de la zone intertropicale. D'octobre 2013 à avril 2014, il a été à l'origine d'une épidémie en Polynésie française. Par ailleurs, au 1<sup>er</sup> décembre 2015, plusieurs États d'Amérique latine (Chili, Brésil, Colombie, Salvador, Guatemala, Mexique, Paraguay, Surinam, Panama, Honduras et Venezuela) ont confirmé la présence du virus. Les CDC ont confirmé le 12 janvier le premier cas importé au Texas chez un voyageur de retour d'Amérique Latine.

Les symptômes de l'infection à virus Zika sont surtout de type grippal (fièvre, maux de tête, courbatures) avec des éruptions cutanées, apparaissant de 3 à 12 jours après la piqûre par un moustique vecteur du Zika. Actuellement le traitement reste uniquement symptomatique.

Une contamination au cours de la grossesse expose l'enfant à des malformations congénitales: des cas de microcéphalie avec mortinatalité au Brésil ont été attribués à une infection gravidique à virus Zika par les CDC, qui ont diffusé une alerte de niveau 2 aux voyageurs potentiels (dont les femmes enceintes) vers Brésil, Colombie, Salvador, Guyane, Guatemala, Haïti, Honduras, Martinique, Mexique, Panama, Paraguay, Surinam, Venezuela et Porto Rico, où le virus est susceptible d'être actif. Tous les pays concernés ont émis ces avertissements à destination des femmes enceintes, pour qu'elles évitent les déplacements à risque. Notamment cet été à Rio, aux Jeux Olympiques! ■■

J.-M. M



## Le syndrome qui justifie la recherche de marqueurs cœliaques

**IBS : irritable bowel syndrome.** En français: syndrome du côlon irritable. Il s'agit de douleurs abdominales qui se manifestent le plus souvent après consommation d'aliments contenant du gluten, et qui peuvent être associées soit à une constipation, soit à des diarrhées, parfois les deux en alternance. Mais le rapport IBS/gluten n'est que de découverte assez récente.

Il n'est pas évident que les professionnels de santé aient connaissance d'un tel rapport. Si oui, ils prescrivent l'exclusion du gluten de l'alimentation et le recours aux aliments sans gluten disponibles dans la grande distribution ou en magasins spécialisés, pris en charge (peu) par la Sécurité sociale sur ordonnance.

Une récente parution rafraîchit les connaissances sur le rapport IBS/gluten. Une étude britannique<sup>1</sup> conclut qu'un régime alimentaire *gluten-free* prescrit par une diététi-

cienne est bénéfique aux patients ayant un IBS et n'ayant jamais envisagé un tel régime d'exclusion du gluten. L'étude a porté sur 41 patients, dont 21 positifs pour l'allèle HLA-DQ2/8 (les autres négatifs), considéré comme favorisant l'intolérance au gluten. Néanmoins le score de sévérité des symptômes d'IBS (IBS-SSS) s'est amélioré chez 71 % (n = 29) des patients à 6 semaines, dont 21 ont adopté le régime *gluten-free* à long terme. Une amélioration d'au moins 50 points correspond à une réponse clinique positive, chez les HLA-positifs comme les HLA-négatifs. Les auteurs précisent que chez les patients ils ont éliminé une maladie cœliaque (stade évolutif de l'intolérance au gluten)... ce qui n'empêche pas l'amélioration de la symptomatologie de l'IBS.

Mais le régime sans gluten est aussi le seul traitement de la maladie cœliaque. Au stade de l'IBS, quand le régime sans gluten n'a pas été envisagé, on peut néanmoins suggérer la recherche de marqueurs de l'intolérance au gluten ou de la maladie cœliaque, et l'on risque alors de tomber juste : soit on

détecte des auto-anticorps circulants, soit une maladie cœliaque. C'est ce qu'a montré une étude princeps publiée en 2001<sup>2</sup>, signalée à l'époque par *RFL*.

Si on manque de données épidémiologiques en France, on constate qu'aux USA la prévalence de la maladie cœliaque a plus que doublé en 20 ans : elle serait de 2 millions, contre 3,5 millions en Europe. Mais une part de cette augmentation aux USA est due à une augmentation du nombre de diagnostics, multiplié par 15 en 20 ans, selon une étude de la Mayo Clinic (Rochester, Minnesota)... même si nombre de maladies cœliaques restent non diagnostiquées. D'où l'intérêt de s'intéresser de plus près aux patients IBS... ■■

J.-M. M.

1. Aziz et coll., *Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016; doi: 10.1016/j.cgh.2015.12.031, on line 31/12/2015.

2. David S. Sanders et coll., *Lancet*, 3/11/2001.



## Adolescents, cibles croissantes du sida

**Le nombre de décès d'adolescents par sida a triplé au cours des quinze dernières années (2000-2015), selon une nouvelle publication de données par l'UNICEF<sup>1</sup>. Le sida est la cause numéro 1 de décès parmi les adolescents en Afrique et la cause numéro 2 chez les adolescents dans le monde. Dans les populations touchées par le VIH, les adolescents sont le seul groupe dans lequel la mortalité ne diminue pas, dit l'UNICEF.**

En Afrique subsaharienne, région du monde ayant la plus haute prévalence, la population féminine est nettement plus touchée, avec 70 % des 15-19 ans, mais les données de l'UNICEF indiquent aussi que seulement 10 % de ce groupe d'âge bénéficient de la recherche du VIH. En outre, il y a un déficit de cette recherche chez les nouveau-nés : moins de la moitié des enfants de moins de 2 mois en bénéficient, et seulement un tiers des 2,6 millions d'enfants de moins de 15 ans VIH-positifs sont traités. Contaminés

par une mère séropositive dans la prime enfance, nombre d'adolescents vivent sans savoir qu'ils sont séropositifs.

La découverte de séropositivité VIH chez les jeunes en France entre 2003 et 2013 semble faire écho à l'alerte de l'UNICEF, selon les données issues de la déclaration obligatoire du VIH chez les 15-24 ans<sup>2</sup> : jeunes adultes (18-24 ans) en 2013 et depuis 2003 et chez les adolescents de 15-17 ans en 2003 à 2013. En 2013, 726 jeunes de 15 à 24 ans ont découvert leur séropositivité VIH, soit 11,7 % de l'ensemble des découvertes et un taux, rapporté à la population du même âge, de 92/million.

Parmi les 686 jeunes adultes (18-24 ans) diagnostiqués en 2013, 68 % étaient des hommes, majoritairement contaminés lors de rapports sexuels entre hommes (HSH) pour 75 % d'entre eux. Depuis 2003, le nombre de découvertes de séropositivité VIH dans ce groupe a fortement augmenté (+157 %). La quasi-totalité (98 %) des jeunes femmes a été contaminée lors de rapports hétérosexuels, dont 71 % nées à l'étranger. La proportion de jeunes adultes contaminés

par usage de drogues injectables était faible (0,4 %). Environ 14 % des diagnostics de cette classe d'âge étaient tardifs (< 200 CD4/mm<sup>3</sup> ou stade sida).

Parmi les 524 adolescents de 15-17 ans ayant découvert leur séropositivité VIH entre 2003 et 2013, près 65 % étaient des femmes (essentiellement nées à l'étranger et contaminées par rapports hétérosexuels). Le mode de contamination principal chez les adolescents masculins était les rapports HSH (49 % d'entre eux). Près de 6 % des découvertes chez les adolescents étaient dues à une transmission du VIH mère-enfant, diagnostiquée tardivement. Les actions de prévention du VIH auprès des adolescents et des adultes jeunes doivent se poursuivre, notamment auprès des jeunes hommes ayant des rapports HSH. ■■

J.-M. M.

1. UNICEF's Statistical Update on Children, Adolescents and AIDS.

[www.childrenandaids.org](http://www.childrenandaids.org)

2. BEH 40-41, 1/12/2015. Florence Lot et coll. (InVS, CNR VIH, AP-HP). [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)

## Un vaccin dengue en phase 3, un autre en service

**Alors que dans le monde on forge déjà des armes vaccinales contre Ebola, chikungunya et Zika, le National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), l'un des instituts biomédicaux des Instituts nationaux de la santé américains (NIH), lance l'essai de phase 3 de son vaccin dengue TV003, dernière étape des essais cliniques avant autorisation de commercialisation (AMM).**

Accusant un retard sur le vaccin de Sanofi Pasteur, c'est le résultat de plusieurs années de développement pour assurer une immunogénicité contre les 4 sérotypes du virus de la dengue. Selon les essais cliniques initiaux au NIAID, une monodose pourrait générer une réponse immunitaire humorale et cellulaire robuste. L'Institut brésilien d'immunobiologie Butantan organise la phase 3, essai multicentrique en double aveugle contre placebo chez 17 000 participants sains

de 2 à 59 ans dans 13 villes du Brésil. Le suivi sera de 5 ans.

Sanofi Pasteur a reçu en décembre au Mexique l'AMM pour Dengvaxia®, premier vaccin tétravalent au monde, pour la prévention d'une des 4 formes virales de dengue chez les pré-adolescents, les adolescents et les adultes de 9 à 45 ans des zones d'endémie. C'est l'aboutissement de 20 ans de recherche et de travail en laboratoire, et sur le terrain avec les autorités de santé publique et la communauté scientifique, souligne Sanofi. Des AMM dans d'autres pays sont en cours d'attribution, Philippines notamment.

La dengue touche nombre de pays d'Amérique Latine et d'Asie, déclenchant quelque 400 millions d'infections chaque année dans 128 pays abritant 4 milliards d'individus. Selon Sanofi, l'incidence de la dengue a augmenté de 30 fois depuis 50 ans.

Quatre sérotypes viraux en sont responsables, mais être atteint d'un seul sérotype (via la piqûre d'*Aedes aegypti*) ne confère une immunité que contre celui-

là, d'où nécessité de vacciner contre les quatre.

En juillet dernier, le *New England Journal of Medicine* a publié l'analyse des données de différentes études cliniques, indiquant que le vaccin de Sanofi Pasteur avait permis de protéger 2 sujets sur 3 âgés de 9 ans et plus (de la préadolescence à l'âge adulte) contre les 4 sérotypes de dengue.

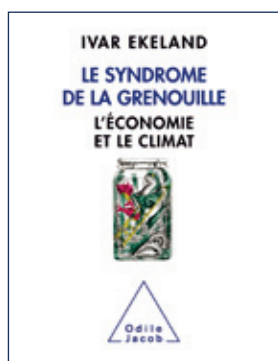
Sanofi Pasteur notait alors : « Cette tranche d'âge représente la plus vaste population à risque ; par leur mobilité, les sujets âgés de 9 ans et plus contribuent à propager l'infection plus largement durant les épidémies, [elle] contribue au poids économique de la dengue, notamment en absentéismes scolaire et professionnel [...]. C'est dans cette population que le poids de la maladie est le plus lourd et que l'impact du vaccin a été démontré. C'est en ciblant cette population que l'on a les meilleures chances de réduire le poids de la dengue ». ■■

J.-M. M.

## LIVRES

## Le syndrome de la grenouille, l'économie et le climat

Une grenouille mise à cuire dans une marmite tolère une élévation régulière de la température de l'eau, alors qu'un ébullitionnement brutal la ferait réagir aussitôt. De même, le réchauffement climatique est insidieux : il n'est perceptible qu'à l'échelle de la décennie, voire du siècle, n'implique aucune décision urgente et, de fait, est régulièrement repoussé sur l'agenda des politiques dont l'horizon excède rarement quelques années ! Or, dans le domaine de l'environnement, le délai entre l'action et son impact est au minimum de 50 ans. Seul un point de vue éthique et anthropologique prenant en compte la survie de l'espèce humaine pourrait résoudre le dilemme, mais en tant que l'*Homo œconomicus* est un individu calculateur agissant par intérêt personnel, et pour lequel l'environnement est une



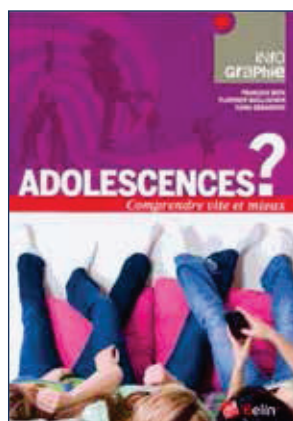
ressource infinie gratuite. Dans le jeu économique, *il n'y a pas de taux d'intérêt écologique*, comme le montre l'inéluctable disparition, sous l'effet des lois économiques, des ressources halieutiques. C'est donc à une conception plus large de l'humanité et à un renouveau de l'éthique que convie l'auteur, à défaut de voir l'espèce humaine, victime de la pensée économique, partager le triste sort de la morue, du thon rouge...

et de la grenouille. L'auteur, mathématicien et économiste, a participé à la chaire Finance et développement durable de l'Université Paris-Dauphine, qu'il a présidée. Il est l'auteur de nombre d'ouvrages de vulgarisation. ■■

Ivar Ekeland. Éditions Odile Jacob.  
[www.odilejacob.fr](http://www.odilejacob.fr)

## Adolescences ?

Envie de comprendre, besoin de repères ? Découvrez qui est l'adolescence d'aujourd'hui grâce à la description la plus objective possible de ses différentes facettes : fille ou garçon, enfant d'ouvrier ou enfant de cadre, comment traverse-t-on l'adolescence ? Les adolescents d'aujourd'hui sont-ils plus précoces, plus mûrs, plus violents, comme on l'entend dire si souvent ? À l'heure du téléphone portable, d'Internet et des réseaux sociaux, comment les adolescents vivent-ils leurs relations avec les autres ? Quelle est leur consommation de tabac, d'alcool et de cannabis ? Comment les adolescents vivent-ils leur scolarité ? Quel est le poids des inégalités sociales sur leur réussite scolaire ? Découvrez les réponses à nombre de questions grâce



à des doubles pages résolument graphiques et faciles à lire, s'appuyant sur des chiffres fiables et sur les savoirs de

la sociologie. Décodez sans parti pris la diversité des opinions grâce à des entretiens avec des experts de premier plan. Trois auteurs s'y sont attachés : François Beck est sociologue à l'Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (INPES) et intervient régulièrement dans les médias pour parler des rapports des adolescents aux substances psycho-actives ; Florence Maillachon est sociologue au CNRS ; Ivana Obradovic est chargée d'études à l'Observatoire français des drogues et toxicomanies (ODFT). ■■

Éditions Belin. [www.editions-belin.com](http://www.editions-belin.com)

## AGENDA mars-juin 2016

### JIB 2016

**22-24 juin 2016**

Paris/Porte de Versailles  
[www.jib-sdbio.fr](http://www.jib-sdbio.fr)

### SNBH

**22-24 juin 2016**

Paris/Porte de Versailles  
[www.snbh.asso.fr](http://www.snbh.asso.fr) – [www.acnbh.org](http://www.acnbh.org)

### Journées francophones d'hépatogastroentérologie et oncologie digestive

**17-20 mars 2016**

Paris/porte Maillot  
[www.jfhod.com](http://www.jfhod.com)

### Forum Labo & Biotech

**30-31 mars 2016**

Lyon  
[www.forumlabo.com](http://www.forumlabo.com)

### Assises de sexologie et de santé sexuelle

**7-10 avril 2016**

Reims  
[www.assises-sexologie.com](http://www.assises-sexologie.com)

### European congress of clinical microbiology & infectious diseases/ECCMID

**9-12 avril 2016**

Istanbul  
[www.eccmid.org/eccmid\\_2016](http://www.eccmid.org/eccmid_2016)

### Hémochromatose : semaine nationale de sensibilisation

**1<sup>er</sup>-6 juin 2016**

[www.hemochromatose.fr/semaine-de-sensibilisation](http://www.hemochromatose.fr/semaine-de-sensibilisation)

### I3S : Symposium international salmonelles/salmonelloses

**6-8 juin 2016**

Saint-Malo  
[www.i3s2016.com](http://www.i3s2016.com)

### Journée nationale de la santé du pied

**9 juin 2016**

[www.sante-du-pied.org](http://www.sante-du-pied.org)

### Symposium international EMBO-ISOPOL Listériose

**14-17 juin 2016**

Paris/Institut Pasteur  
[www.pasteur.fr](http://www.pasteur.fr)

## Du *super-lourd* dans la nouvelle table de Mendeleïev

Quand le chimiste russe Dimitri Mendeleïev créa en 1869 la première table de classification systématique des éléments chimiques connus à l'époque, il avait déjà anticipé de pouvoir y ajouter d'autres éléments qui restaient à découvrir, et de prédire leurs propriétés chimiques grâce à leur configuration électronique. Près de 150 ans séparent les quelques lignes écrites de sa main du tableau actuel... qui, après la reconnaissance des éléments 114 et 116 en 2011, vient de s'enrichir à nouveau, en 2016, de quatre nouveaux éléments : 113, 115, 117 et 118. Bien qu'ils ne soient pas encore réellement baptisés, les « petits nouveaux » (ununtrium, ununpentium, ununseptium et ununoctium) complètent la septième ligne d'un tableau, comportant 18 colonnes et 7 lignes, regroupant tous les éléments chimiques connus, ordonné par un numéro atomique (nombre de protons d'un atome) croissant.

C'est en tentant de découvrir des éléments dits transuraniens, dont le numéro atomique est supérieur à celui de l'uranium, l'atome le plus lourd connu sur Terre, que les physiciens ont découvert ces quatre nouveaux éléments qui ne sont pas si nouveaux ni si naturels... *Pas si nouveaux*, car ces éléments, par-

ticulièrement lourds puisqu'ils possèdent respectivement 113, 115, 117 et 118 protons, n'existent pas dans la nature et ont été obtenus dans des accélérateurs de particules, il y a près de 10 ans pour certains d'entre eux ! Leur inscription récente (le 30 décembre 2015) au tableau périodique des éléments est en effet due au délai nécessaire à la validation de leurs découvertes par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) et son équivalent en physique (IUPAP).

**Quatre nouveaux atomes super-lourds de 113, 115, 117 et 118 protons complètent la 7<sup>e</sup> ligne du tableau périodique des éléments.**

*Pas si naturels*, car ces éléments super-lourds sont créés artificiellement par collisions entre atomes plus petits projetés à très haute vitesse et ont une durée de vie extrêmement brève, bien inférieure au cen-

tième de seconde. Leur découverte est le fruit d'une collaboration russo-américaine entre les instituts de Doubna (Russie), d'Oak Ridge et de Lawrence Livermore (États-Unis) pour l'ununpentium et l'ununseptium, et entre Doubna et Livermore, pour l'ununoctium ; celle de l'ununtrium a été réalisée à l'Institut de recherches Riken au Japon.

Le septième rang venant d'être complété, la question est : à quand la découverte d'un élément chimique de nombre atomique de 119, voire au-delà, ouvrant ainsi une 8<sup>e</sup> période chimique dans la quête de cet *ilot de stabilité nucléaire* auquel rêvent les physiciens ? Bien que l'intérêt d'une telle découverte pour le médecin et le biologiste reste encore du domaine cognitif, il y a fort à penser qu'une application médicale est à venir. À chacun ses rêves... ■■

<http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/la-classification-periodique-de-lavoisier-a-mendeleiev-1229>

<http://www.iupac.org/news/news-detail/article/discovery-and-assignment-of-elements-with-atomic-numbers-113-115-117-and-118.html>

## Dans les algues, un nouveau traitement du diabète

L'encapsulation de cellules productrices d'insuline dans des contenants dérivés d'alginate protège leur implantation post-greffe en les rendant *invisibles* au système immunitaire, et permet la restauration de la régulation glycémique dans un modèle animal de diabète de type 1.

Après avoir été utilisé comme engrais, puis pour sa teneur en soude et en iode, le goémon que l'on découvre sur les plages bretonnes, et en particulier sous forme d'algues brunes, est actuellement très recherché pour ses alginates. Grâce à leurs propriétés épaississantes et gélifiantes, ces polysaccharides sont utilisés dans de très nombreux domaines tels que l'alimentation, la papeterie, le textile, la céramique, la cosmétique...

Deux études publiées par une équipe du prestigieux Massachusetts Institute of Technology (MIT), dont les résultats viennent de paraître dans les revues scientifiques *Nature Medicine* et *Nature Biotechnology*, montrent que ces alginates pourraient avoir une fonction dans le traitement du diabète de type 1. Dans cette forme de diabète, la destruction des cellules bêta formant les îlots de Langerhans, dont le rôle majeur est la production d'insuline par le pancréas, conduit à un défaut de régulation du taux de sucre sanguin. Comme la raison de cette destruction est toujours inconnue, les traitements actuels pallient au manque d'insuline en complétant quotidiennement l'organisme en hormone par voie exogène (injections, pompe...).

Récemment, de nouvelles approches ont vu le jour comme la greffe de cellules bêta saines qui permet de reproduire une production endogène de la précieuse insuline. Ces différents traitements sont très contraignants pour le patient, d'autant plus que, dans le cas des greffes de cellules de pancréas, un traitement immunosuppresseur à vie est indispensable pour éviter leur rejet.

L'avancée technologique et médicale à retenir des travaux d'Arturo J. Vegas et coll. est la réussite de l'encapsulation de cellules insulino-gènes à partir de dérivés d'alginate pour les rendre *invisibles* au système immunitaire et donc prolonger leur fonctionnement après greffe. Cela paraît simple mais pour y parvenir, les chercheurs ont tout d'abord créé

une *bibliothèque* de près de 800 dérivés d'alginate, dont ils ont testé l'efficacité sur la souris et sur le primate.

Il s'agissait de sélectionner des dérivés qui, une fois implantés sous forme d'une capsule gélifiée (hydrogel), ne provoquaient pas de tissu cicatriciel de type fibrose autour de la capsule, ce qui bloquerait la libération de la protéine produite par les cellules greffées. Les chercheurs ont ensuite testé le dérivé le plus efficace, le triazole-thiomorpholine dioxide (TMTD), sur des souris diabétiques. Dans ce but, des cellules d'îlots pancréatiques, produites à partir de cellules souches embryonnaires humaines et encapsulées dans un gel de TMTD, ont été implantées dans la cavité péritonéale de souris immunocompétentes porteuses d'un diabète de type 1 chimio-induit. Les auteurs ont alors observé que la glycémie des souris qui avaient reçu l'implant était corrigée et que cette correction était maintenue pendant

les 174 jours de l'expérience, sans aucun traitement immunosuppresseur. De façon intéressante et surprenante, au terme des 6 mois d'expérience, les cellules humaines étaient toujours vivantes et la concentration du peptide C humain, reflet du potentiel insulino-sécréteur des cellules implantées, restait quasi inchangée.

De tels résultats suscitent un intérêt thérapeutique majeur pour le patient diabétique, qui n'aurait plus à subir des injections répétées d'insuline et dont les cellules greffées ne seraient pas rejetées. Mais quelles sont les étapes à franchir avant une application à l'Homme ? Certaines sont en voie d'être atteintes puisque les auteurs de cette étude viennent de montrer que l'implantation sur le primate de capsules similaires, mais non colonisées par des cellules bêta, inhibait la réponse des macrophages et ne provoquait pas la fibrose tant redoutée (*Nature Biotechnology*). D'autres étapes restent à franchir,

telles l'étude de la production d'insuline à long terme à partir de cellules humaines dans un modèle de diabète chez le primate, la mise au point d'un hydrogel plus performant et plus stable, la compréhension des mécanismes d'immunotolérance conférée par le gel d'alginate. Comme souvent en recherche translationnelle, cela prendra du temps, mais, c'est une piste supplémentaire qui, développée en parallèle de celle du pancréas artificiel dans lequel l'injection d'insuline se fait de façon automatique et passive à partir d'une mesure en continu du taux de glucose sous-cutané (essais cliniques en cours), sont autant d'espoirs d'améliorer significativement le traitement et les conditions de vie des patients atteints de diabète de type 1. ■■

Vegas AJ, et coll. *Nat Med.* 2016 Jan 25. doi: 10.1038/nm.4030. [Epub ahead of print].

Vegas AJ, et coll. *Nat Biotechnol.* 2016 Jan 25. doi: 10.1038/nbt.3462. [Epub ahead of print].

## Le microbiote vaginal, une protection pour le nouveau-né

Le microbiote désigne l'ensemble des microorganismes d'une flore donnée. En fonction du lieu de vie de cette flore, on décrit différents types de microbiotes : cutané, intestinal, vaginal...

Un nombre croissant de publications suggèrent des liens entre les microorganismes du tube digestif et diverses pathologies métaboliques, inflammatoires, immunitaires, voire mentales, tandis que d'autres démontrent le rôle protecteur de certaines bactéries intestinales. L'impact sur la santé des milliards de bactéries qui vivent en symbiose avec l'Homme est devenu tellement important que certains qualifient le microbiote de *nouvel organe*. Des études récentes suggèrent que la colonisation de l'intestin par des bactéries pourrait se produire très tôt, *in utero*. En effet, il a été montré que le méconium, qui correspond aux premières selles du nouveau-né, contenait déjà des bactéries.

Cependant, le microbiote est majoritairement transmis à la naissance lors du contact du nouveau-né avec le microbiote maternel, en particulier vaginal, au moment de l'accouchement. Dans une étude que publie *Nature Medicine*, M.G Dominguez-Bello et coll. (Université de New York) notent que les bébés nés par la césarienne n'auraient pas le même microbiote intestinal que les enfants nés par voie basse et que celui-ci serait plus proche du microbiote cutané, retrouvé sur la

peau maternelle. Ces enfants semblent en particulier manquer de certaines bactéries de type Bifidobactéries et Bactéroïdes, qui constituent une part importante de la flore intestinale. En dehors de leur rôle immunomodulateur, ces bactéries sont importantes car elles créent un micro-environnement favorable à la colonisation du système digestif du nouveau-né par ces bactéries dites *utiles*. À noter que des données épidémiologiques suggèrent que les enfants nés par césarienne présenteraient un risque plus élevé de souffrir de pathologies métaboliques et auto-immunes : M.G Dominguez-Bello et coll. se sont demandé si l'on ne pouvait restaurer leur microbiote. Ils ont alors conduit une étude-pilote chez 11 bébés nés par césarienne qui étaient ou non mis en contact à la naissance, au niveau de la peau et de la bouche, avec la flore vaginale de leur mère. Le microbiote intestinal de ces bébés était comparé un mois après leur naissance avec celui de 7 bébés nés par voie basse et ayant donc été naturellement en contact avec la flore vaginale maternelle. L'analyse génomique de l'ADN bactérien présent dans les selles montre que le contact avec les sécrétions vaginales permettait aux bébés nés par césarienne d'acquérir rapidement une flore intestinale enrichie en bactéries qui leur faisaient défaut. En effet, un mois après la naissance, la flore intestinale des bébés ayant été mis en contact

avec la flore vaginale maternelle juste après la césarienne était beaucoup plus proche de celle des bébés dont les mères avaient accouché par voie basse par rapport à celle des enfants nés par césarienne, mais non exposés aux sécrétions vaginales.

Les résultats de ces travaux sont particulièrement prometteurs et leur application dans les maternités semblerait simple. C'est sans compter avec les questions auxquelles il faut d'abord répondre.

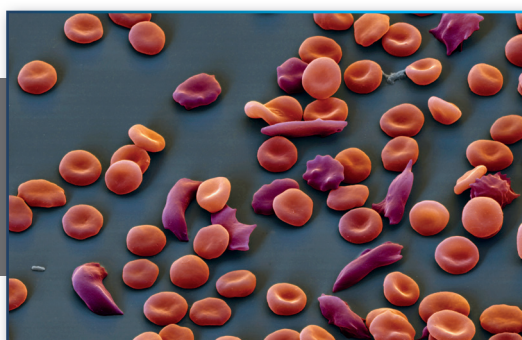
Les auteurs se sont déjà engagés dans cette démarche en augmentant de façon significative le nombre de bébés étudiés ainsi que la durée de l'étude, en intégrant le type d'alimentation reçue (lait maternel ou lait maternisé) dans l'analyse, en étudiant si le traitement antibiotique donné aux patientes ayant subi une césarienne modifie les résultats en termes de diversité bactérienne... Il sera également indispensable de vérifier l'absence de transmission de pathologies maternelles, dont les maladies sexuellement transmissibles, par les sécrétions vaginales. Ces résultats posent également la question pertinente des mécanismes par lesquels les bactéries maternelles *éduquent* le système immunitaire du nouveau-né. ■■

Dominguez-Bello MG, et coll. *Nat Med.* 2016 Feb 1. doi: 10.1038/nm.4039. [Epub ahead of print]



## Les maladies de l'hémoglobine

Bruno Baudin<sup>a</sup>



### AVANT-PROPOS

**N**ous connaissons tous l'hémoglobine par nos études, toubibs, potards et autres scientifiques; nous savons son importance dans les échanges gazeux liés à la respiration et les troubles induits par sa diminution de production, de stabilité ou encore de solubilité. Mais, les méthodes d'étude des maladies de l'hémoglobine, car c'est ainsi que nous allons les appeler ou encore hémoglobinopathies, ont beaucoup évolué et sont maintenant soumises à une réglementation précise. La connaissance sur les gènes gouvernant la synthèse des chaînes de globine a littéralement explosé, et la prise en charge des hémoglobinopathies, dont leur diagnostic précoce, néonatal et prénatal, a énormément progressé avec une organisation sur le territoire national basée sur 6 centres spécialisés. Deux régions sont particulièrement concernées: l'Ile-de-France et la région PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur)

par leur large accueil de populations issues des zones à risque comme l'Afrique sub-saharienne, les départements français d'outre-mer (Antilles, Guyane, Réunion et Mayotte), l'Afrique du nord (Algérie, Tunisie, Maroc), l'Amérique du Sud et les Américains noirs du Nord, ajoutons tout le Moyen-Orient et le pourtour méditerranéen (surtout Turquie, Grèce et Italie du Sud).

Depuis leur découverte, l'hémoglobine et ses maladies sont partagées entre hématologistes et biochimistes. Pour les premiers, l'hémoglobine est le constituant majeur des hématies, ou érythrocytes ou encore globules rouges; pour les seconds, il s'agit d'une protéine et même le modèle d'une protéine de transport et de régulation allostérique, oh le gros mot! La drépanocytose, maladie héréditaire, connue en Afrique de souvenirs immémoriaux, est parue au grand jour en 1910 en examinant le sang de malades drépanocytaires avec l'observation d'hématies en forme de faucille (dits pour cela falciformes). Il s'agit bien d'une maladie hémato-logique, car elle s'accompagne d'anémie hémolytique et de troubles vasculaires sévères. Depuis 1920, on sait qu'elle est une maladie génétique de transmission autosomique récessive; voici que les généticiens viennent apporter leur grain de sel. Et les biochimistes rentrent en scène avec leurs fameuses méthodes, qu'en fait ils ont piquées aux physiciens! Ainsi, dès 1949, grâce à l'électrophorèse, on sait différencier l'hémoglobine mutante, l'hémoglobine S, de l'hémoglobine normale, dite A.

**a** Pôle de Biologie Médicale et Pathologie - Service de Biochimie - Responsable de l'UE de Biochimie Spécialisée

Hôpital Saint-Antoine - Bât. R. André

184, rue du Fbg Saint-Antoine

75571 Paris cedex 12

et INSERM UMR 1193 - UFR Pharmacie - Châtenay-Malabry  
Université Paris-Sud

\* Correspondance

\* bruno.baudin@aphp.fr

En 1957, on découvre la mutation sur le gène codant la chaîne de la globine  $\beta$ , amenant à remplacer le glutamate en position  $\beta 6$  par une valine plus hydrophobe, et c'est le début de tous les maux. Excellent exemple pour les étudiants : en modifiant une base dans un exon d'un gène, par le code génétique dérogé on change un résidu d'acide aminé dans la protéine et cela peut suffire à lui faire perdre un peu de solubilité dans l'eau, et donc dans le cytosol des hématies, où elle va précipiter en s'agrégeant. L'hématie ainsi pourvue va se tordre en passant dans les capillaires les plus fins, les obstruant, et menant à une élimination accélérée dans le foie et la rate ; l'anémie s'installe et finira un jour par devoir être traitée par transfusion.

Pour les thalassémies, le problème est d'emblée différent, le défaut génétique touche l'une des chaînes de globine donnant des  $\alpha$ -thalassémies et des  $\beta$ -thalassémies ; les défauts quantitatifs vont dépendre de l'âge et du type de mutation, amenant à tout un kaléidoscope d'expressions phénotypiques et donc compliquant le diagnostic et la prise en charge.

Qui pouvait le mieux coordonner un dossier scientifique de la Revue Francophone des Laboratoires sur les « maladies de l'hémoglobine » : un hématologue, un biochimiste, un généticien, un pédiatre, un hématalogue ? Nul ne le saura jamais ; les dés sont jetés et ont choisi les biochimistes. Ainsi, je peux proposer deux biochimistes pour les premiers articles dévolus au fondamental et à l'analyse phénotypique, puis pour les quatre autres articles il s'agira de médecins et de biologistes hématologistes ou généticiens des centres de référence d'Ile-de-France (disons surtout de Paris) et de Marseille en région PACA. Attention, ça va saigner, l'hémoglobine va couler... mais sans tacher !

Ainsi, le premier article, consistera surtout en rappels sur la structure, les fonctions, la synthèse et le catabolisme des hémoglobines normales. Après une brève description des principales anomalies touchant les hémoglobines, seront donnés les principes des méthodes d'études structurales, qualitatives et quantitatives (**Bruno Baudin** « Hémoglobines normales et pathologiques »).

Le deuxième article a été confié à **Nathalie Mario et N. Salaa**, du laboratoire de biochimie spécialisé pour le « Diagnostic biologique des hémoglobinopathies », grandes spécialistes du domaine depuis plusieurs années avec, au laboratoire, deux CLHP et une électrophorèse capillaire dédiées à ces diagnostics. **Nathalie Couque, E. Trawinski et J. Elion**, biologistes à l'Hôpital Robert Debré (APHP), font le point sur la « Génétique des maladies de l'hémoglobine »,

les aspects génotypiques venant compléter les précédents.

Les deux articles suivants concernent le diagnostic et la prise en charge thérapeutique de ces maladies, le premier sur « La drépanocytose en France » par **Sarah Mattioni, K.-S. Stojanovic, R. Giro et F. Lionnet** (Service de médecine interne, Centre de la drépanocytose, Hôpital Tenon, HUEP-APHP, Paris), et le second sur « Les thalassémies en 2016 » par **Nathalie Bonello-Palot, M. Cerino, P. Joly et C. Badens** (Laboratoire de génétique moléculaire, Département de génétique médicale, Hôpital d'enfants de La Timone, CHU de Marseille, APHM et Unité de pathologie moléculaire du globule rouge, Laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, Hôpital Edouard Herriot, Hospices civils de Lyon). Enfin, *the last but not the least!* **Bichr Allaf, N. Couque et M. Benkerrou** traiteront du « Dépistage néonatal de la drépanocytose » (Services de biochimie et de génétique moléculaire et d'hématologie, Centre de référence de la drépanocytose, Hôpital Robert Debré, APHP, Paris).

Nous voilà armés, il est vrai pour une activité de biologie assez spécialisée, mais tout à fait passionnante. La génétique avance, la technologie aussi, la prise en charge de ces maladies et les diagnostics néonatal et prénatal posent des problèmes médicaux et sociétaux. Il nous a semblé opportun d'en tenir informé le plus grand nombre de nos collègues. Bonne lecture.

## Sommaire thématique

- Les hémoglobines normales et pathologiques..... p. 27
- Diagnostic biologique des hémoglobinopathies ..... p. 35
- Génétique des maladies de l'hémoglobine ..... p. 49
- La drépanocytose en France..... p. 61
- Les thalassémies en 2016 ..... p. 67
- Dépistage néonatal de la drépanocytose..... p. 77
- QCM ..... p. 84

La coordination de ce dossier a été assurée par le Pr Bruno Baudin, Service de Biochimie, Pôle Biologie médicale et pathologie, Responsable de l'UF de Biochimie Spécialisée, Hôpitaux universitaires de l'Est Parisien (AP-HP), Site Saint-Antoine, Paris et INSERM UMR 1193, UFR Pharmacie, Châtenay-Malabry, Université Paris-Sud.

# Les hémoglobines normales et pathologiques

Bruno Baudin<sup>a</sup>

## RÉSUMÉ

L'hémoglobine est la principale protéine des globules rouges assurant le transport de l'oxygène (O<sub>2</sub>) du poulmon vers les tissus et le retour du gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) des tissus vers le poulmon. Sa structure oligomérique permet une régulation fine par l'O<sub>2</sub> lui-même (effet allostérique) et par le pH et le 2,3-diphosphoglycérate. Le fer (Fe<sup>2+</sup>) de la molécule d'hème portée par les chaînes de globine constitutives de l'hémoglobine assure la liaison de l'O<sub>2</sub>. Des mutations sur les gènes codant pour les chaînes de globine peuvent modifier la solubilité, la stabilité, l'affinité pour l'O<sub>2</sub>, la liaison du Fe<sup>2+</sup> ou son état d'oxydation, de l'hémoglobine. La mutation la plus fréquente est celle responsable de la drépanocytose avec apparition d'HbS de migration anormale à l'électrophorèse et d'hématies falciformes. D'autres mutations amènent à des protéines mutantes moins solubles et de migrations anormales; on regroupe cet ensemble sous le terme d'hémoglobinoses, ou anomalies qualitatives de l'hémoglobine. D'autres types de mutations se manifestent par des anomalies quantitatives, dites thalassémies, avec défaut de synthèse de la chaîne  $\alpha$  dans les  $\alpha$ -thalassémies et de la chaîne  $\beta$  dans les  $\beta$ -thalassémies. L'exploration de ces anomalies qualitatives ou quantitatives passe par des méthodes séparatives basées sur des différences de charges électriques, comme l'électrophorèse alcaline ou acide en gel ou en capillaire, l'isoélectrofocalisation et la chromatographie d'échange d'ions. Il sera souvent nécessaire de disposer de dosages fiables en Hb anormale, HbF et HbA2 auxquels on peut ajouter la numération-formule sanguine montrant l'anémie hémolytique et la génétique moléculaire pour identifier la mutation. D'autres analyses plus spécialisées sont réservées aux centres de référence.

**Chromatographie – drépanocytose – électrophorèse – hémoglobine – hémoglobinopathies – isoélectrofocalisation – thalassémies.**

## 1. Introduction

L'hémoglobine des érythrocytes (ou hématies) des vertébrés transporte l'oxygène des poulmons aux tissus; l'oxygène, ou plutôt la molécule de dioxygène (O<sub>2</sub>), est liée aux atomes de fer des quatre groupements héminiques portés par les chaînes de globine. L'hémoglobine est le constituant majeur des érythrocytes. Des mutations portant sur des sites de fixation de l'hème, ou touchant à la stabilité ou à la solubilité

**a** Pôle de Biologie Médicale et Pathologie - Service de Biochimie - Responsable de l'UF de Biochimie Spécialisée

Hôpital Saint-Antoine - Bât. R. André

184, rue du Fbg Saint-Antoine

75571 Paris cedex 12

et INSERM UMR 1193 – UFR Pharmacie – Châtenay-Malabry

Université Paris-Sud

\* Correspondance

\* bruno.baudin@aphp.fr

article reçu le 21 janvier, accepté le 2 février 2016

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

## SUMMARY

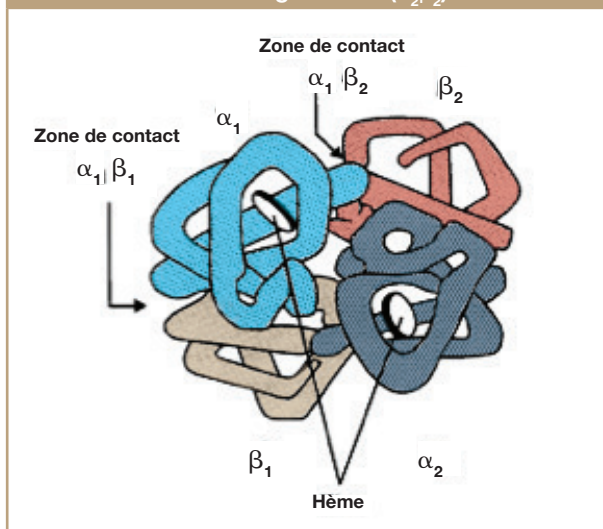
### Normal and pathological hemoglobins

Hemoglobin is the major protein in red cells responsible for the transport of oxygen (O<sub>2</sub>) from lung toward tissues and coming back of carbonic gas (CO<sub>2</sub>) from tissues toward lung. Its oligomeric structure allows a fine regulation by O<sub>2</sub> it-self (allosteric effect) and by pH and 2,3-diphosphoglycerate. Iron ion (Fe<sup>2+</sup>) in the heme molecule carried by globin chains constitutive of hemoglobin is responsible for O<sub>2</sub> transport. Mutations in genes encoding globin chains can modify solubility, stability, affinity for O<sub>2</sub>, linkage of Fe<sup>2+</sup> or its oxidative state, of hemoglobin. The most usual mutation is that responsible for sickle cell disease with the appearance of HbS with abnormal migration in electrophoresis. Other mutations lead to mutant proteins less soluble and with abnormal migration; this group of diseases is called hemoglobinoses, or qualitative abnormalities of hemoglobin. Other types of mutations are characterized by quantitative abnormalities, called thalassemia, with the defect in the synthesis of the  $\alpha$ -chain in  $\alpha$ -thalassemia or the  $\beta$ -chain in  $\beta$ -thalassemia. The exploration of these qualitative or quantitative abnormalities needs separative methods based on the differences in electric charges, such as alkaline or acidic electrophoresis in a gel or a capillary, isoelectrofocusing and ion-exchange chromatography. Often it would be necessary to quantify the abnormal Hb, also HbF and HbA2 with blood counting showing the hemolytic anemia and molecular genetics for the identification of the mutation. Other more specialized analyses are reserved to reference centers.

**chromatography – sick cell disease – electrophoresis – hemoglobin – hemoglobinopathies – isoelectrofocusing – thalassemia.**

de la protéine, se manifestent par des pertes d'érythrocytes à l'origine d'anémie. Ces maladies qualitatives de l'hémoglobine sont appelées hémoglobinoses, dont la principale et la plus redoutée est la drépanocytose avec l'apparition d'hématies falciformes (en faucille). D'autres maladies touchent la synthèse des chaînes de globine; elles ont donc aussi une origine génétique et leurs défauts quantitatifs sont appelés hémoglobinopathies. Ces maladies sont aussi accompagnées d'anémie et de façon plus caractéristique d'anémie hémolytique. Avant d'entrer dans le vif du sujet, diagnostic et prise en charge des maladies de l'hémoglobine, il nous a paru nécessaire de rappeler la structure de cette protéine, ses fonctions biologiques normales, sa synthèse sous ses différentes formes, les anomalies touchant cette biosynthèse, enfin les méthodes qui permettent de les explorer.

Figure 1 – Structure quaternaire de l'hémoglobine A ( $\alpha_2\beta_2$ ).



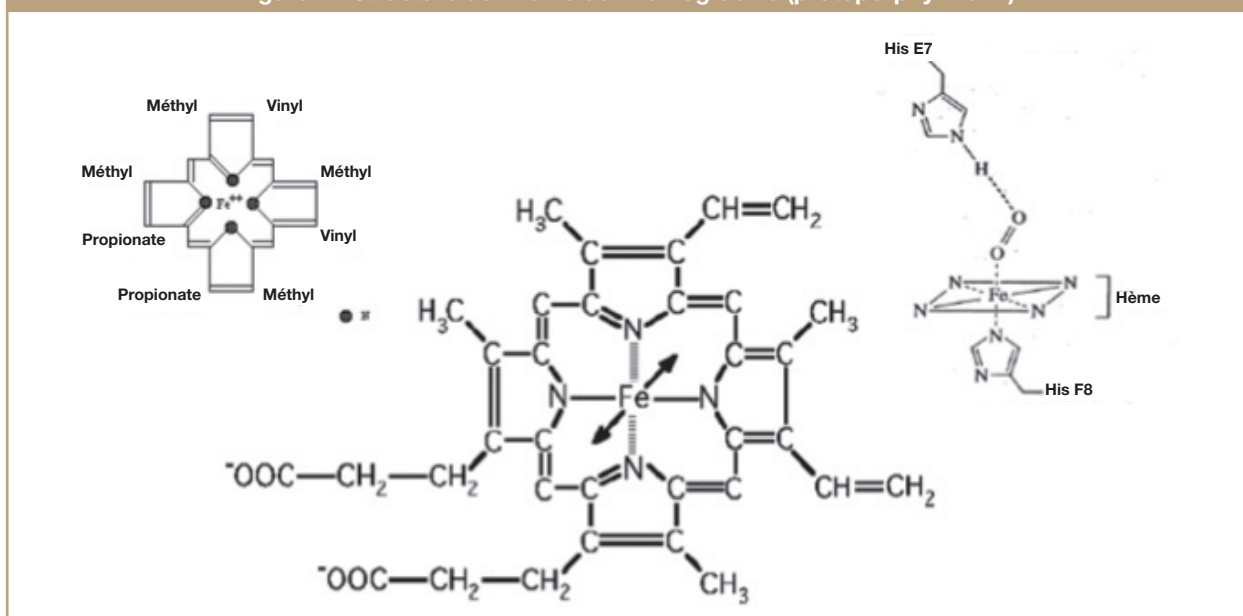
Structure quaternaire de l'hémoglobine A ( $\alpha_2\beta_2$ ) avec les zones de contact permettant la transition allostérique régulant sa fonction oxyphorique.

## 2. Structure et fonctions des hémoglobines

L'hémoglobine ou plutôt les hémoglobines sont constituées de quatre chaînes polypeptidiques, les chaînes de globine, dont il existe plusieurs entités (leur structure primaire). Normalement, une molécule d'hémoglobine est formée de deux types de chaînes, identiques deux à deux. L'hémoglobine A (HbA), la forme majoritaire circulant dans le sang des adultes de l'espèce humaine (*homo sapiens sapiens*), un vertébré mammifère, est constituée de deux

chaînes de type alpha ( $\alpha$ ) et deux chaînes de type bêta ( $\beta$ ) (figure 1). La chaîne  $\alpha$  comporte 141 résidus d'acides aminés et la chaîne  $\beta$  146 ; les deux types de chaînes comportent de nombreux résidus d'acides aminés dans les mêmes positions ; on en retrouve de nombreux en commun aussi avec la chaîne polypeptidique de la myoglobine qui se trouve dans le cytosol des cellules musculaires, portant une seule molécule d'hème donc une seule molécule de dioxygène. Ce fort taux d'homologies concerne tout particulièrement les deux résidus d'histidine qui réalisent des liaisons de coordination métallique avec l'atome de fer fixé dans la molécule d'hème. L'un de ses résidus histidine (His distale) lie directement le fer sous forme  $Fe^{2+}$ , l'autre (His proximale) le lie par l'intermédiaire de la molécule d' $O_2$  quand l'hémoglobine est oxygénée (dite alors oxyhémoglobine). Les chaînes de globine portent toutes de nombreuses hélices alpha (hélices classiques 3,6-13) dans leur structure secondaire, 7 pour la chaîne  $\alpha$  (notées de A à G) et 8 pour la chaîne  $\beta$  (notées de A à H). La poche contenant l'hème se trouve entre les hélices E et F pour les deux types de chaînes. L'ion  $Fe^{2+}$  est lié à l'His F8 en position 87 dans la chaîne  $\alpha$  et en position 92 dans la chaîne  $\beta$ . L'His proximale est dans l'hélice D. L'hémoglobine est une métalloprotéine à fer, porteuse de groupements prosthétiques (non peptidiques) de nature hémique, la protoporphyrine IX (figure 2). Les structures tertiaire (conformation 3D) et quaternaire (association des chaînes) de l'hémoglobine ont été analysées par diffraction des rayons X (radiocristallographie). Ces analyses ont montré l'orientation des hélices, la nature des contacts entre les chaînes en confirmant la structure oligomérique à quatre chaînes. Les contacts  $\alpha_1\beta_1$  et  $\alpha_2\beta_2$  sont très étroits et apolaires ; les contacts  $\alpha_1\beta_2$  et  $\alpha_2\beta_1$  sont moins rigides, quant aux contacts homologues  $\alpha_1\alpha_2$  et  $\beta_1\beta_2$ , ils sont très faibles permettant des modifications conformationnelles (figure 1). La fixation de molécules d' $O_2$  induit

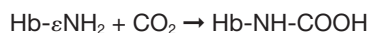
Figure 2 – Structure de l'hème de l'hémoglobine (protoporphyrine IX).



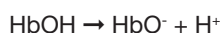
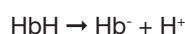
Structure de l'hème de l'hémoglobine (protoporphyrine IX) avec, à droite, la liaison de l' $O_2$  dans l'hème par l'ion  $Fe^{2+}$  chélaté par liaison de coordination entre les cycles pyrroliques de la porphyrine et les histidines proximale et distale des chaînes de globine.



une transition allostérique faisant passer l'hémoglobine d'une forme tendue peu affine pour  $O_2$  (T ou «tight») à une forme oxygénée relâchée (R ou «relax») plus affine pour  $O_2$  (oxyhémoglobine). Dans le modèle allostérique concerté (ou modèle de Monod-Wyman-Changeux), les quatre chaînes de globine changent conjointement de conformation en s'éloignant les unes des autres de quelques dizaines d'angströms (quelques nanomètres) au niveau des contacts les plus lâches [1]. À ces effets allostériques homotropes (dus à l' $O_2$  lui-même), s'ajoutent des effets allostériques hétéotropes (dus à d'autres molécules) : l'affinité de l'hémoglobine pour l' $O_2$  est diminuée par le  $CO_2$  qui se lie aux chaînes de globine par carbamylation de résidus lysine (en position  $\epsilon$ ) :



Cette liaison du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) diminuant l'affinité de l'hémoglobine pour l' $O_2$ , donc en stabilisant l'état T, est appelée effet Haldane ; il va aussi diminuer le pH en remplaçant une fonction amine basique par une fonction carbamate acide faible. Le pH est encore abaissé par l'activité cellulaire (la respiration aérobie acidifie la mitochondrie). Le  $CO_2$  est produit par le métabolisme oxydatif cellulaire au cours des décarboxylations (cycle de Krebs dit de l'acide citrique) ; l'hémoglobine apporte l' $O_2$  nécessaire à la respiration cellulaire dont le but est de produire de l'ATP, et se charge en  $CO_2$  pour l'éliminer sous forme gazeuse dans l'expiration, alors que l' $O_2$  rentre dans les poumons lors de l'inspiration. Un pH bas diminue l'affinité de l'hémoglobine pour l' $O_2$ , c'est l'effet Bohr, bien connu des physio-pathologistes de la respiration et des réanimateurs. Le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG), produit de la glycolyse, diminue lui aussi l'affinité de l'hémoglobine pour l' $O_2$  en stabilisant la forme désoxygénée, signifiant à l'organisme que quand la glycolyse est active, il y a moins besoin d' $O_2$  pour synthétiser de l'ATP, les phosphorylations oxydatives étant suffisamment efficaces (autocontrôle énergétique). Si on compare les courbes de saturation de l'hémoglobine par l' $O_2$  on voit l'effet homotrope qu'il produit sur elle (sigmoïde) alors qu'il ne le fait pas sur la myoglobine (hyperbole) (figure 3). Donc, quand la  $pO_2$  est élevée (alvéoles pulmonaires et artères), hémoglobine et myoglobine sont également saturées, alors que dans les veines où la  $pO_2$  est plus faible, seule la myoglobine est à demi-saturation alors que l'hémoglobine ne porte presque plus d' $O_2$  ; elle le transfère sur la myoglobine tissulaire afin d'oxygéner les tissus aérobie. L'affinité pour l' $O_2$  est plus grande pour la myoglobine que pour l'hémoglobine F (dite fœtale), elle-même plus grande que pour l'hémoglobine A. L'hémoglobine possède un caractère amphotère : basique par carbamylation (fixation de l'acide carbonique) et acide en se déprotonant, pour la forme oxygénée comme pour celle désoxygénée :



Ce caractère apporte à l'hémoglobine un pouvoir tampon important étant donné sa concentration d'environ 150 g/L. L'hémoglobine possède aussi des propriétés peroxydasiques :

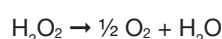
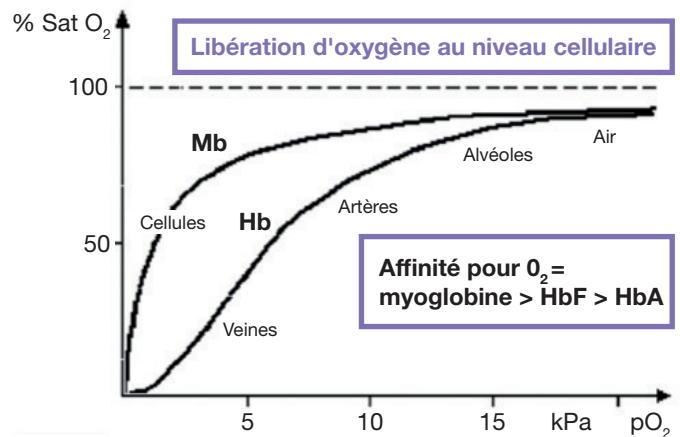
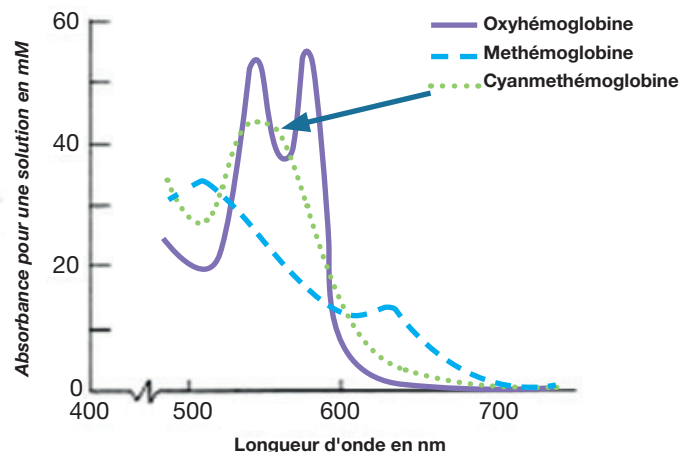


Figure 3– Courbes de saturation par l'oxygène ( $O_2$ ).



Courbes de saturation par l'oxygène ( $O_2$ ) comparées entre l'hémoglobine A (Hb) des globules rouges et la myoglobine (Mb) des cellules périphériques.

Figure 4– Spectre UV-visible de différentes formes de l'hémoglobine.



Spectre UV-visible de différentes formes de l'hémoglobine : oxyhémoglobine ( $Fe^{2+}$ ,  $O_2$ ), méthémoglobine ( $Fe^{3+}$ ) et cyanmethémoglobine formée dans la réaction de Drabkin.

La molécule complète d'hémoglobine (avec fer héminique) absorbe dans l'ultraviolet à 415 nm (bande de Soret, qui représente l'absorption des électrons  $\pi$  du noyau porphyrine) et dans le visible entre 500 et 600 nm (couleur rouge) ; après traitement au ferricyanure (réactif de Drabkin), elle devient bleue (pic à 540 nm) et après oxydation en méthémoglobine ( $Fe^{3+}$ ), elle absorbe à 630 nm (figure 4) [1, 2].

### 3. Biosynthèse et dégradation des hémoglobines

Les chaînes de globine sont synthétisées dans les érythroblastes, issus de cellules souches hématopoïétiques. Les gènes structuraux sont au nombre de deux pour la chaîne  $\alpha$ , situés côte à côte, issus d'une duplication génique, et situés à une extrémité télomérique du chromosome 16,

**Tableau I : Valeurs normales des différentes hémoglobines à la naissance et à l'âge adulte.**

| Hémoglobines                | Nouveau-né | Adulte |
|-----------------------------|------------|--------|
| HbA ( $\alpha_2\beta_2$ )   | 20-40 %    | > 97 % |
| HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ ) | < 0,5 %    | 2-3 %  |
| HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ )  | 60-80 %    | < 1 %  |

mais un seul pour la chaîne  $\beta$  situé à une extrémité téléomérique du chromosome 11<sup>(1)</sup>. Ces gènes sont régulés par d'autres gènes réalisant une coordination de synthèse entre eux et pendant la mitose. La molécule d'hème est synthétisée dans la mitochondrie, puis le cytosol, à partir d'acides aminés (porphyrinosynthèse); dans la dernière étape, l'atome de fer se lie par coordination métallique sur les molécules de protoporphyrine IX. Les quatre chaînes s'associent dans le cytosol pour former la molécule d'hémoglobine prête à lier du dioxygène (érythrocytes matures passant dans la circulation sanguine). À l'âge embryonnaire, les gènes tau ( $\tau$ ) et epsilon ( $\epsilon$ ) sont seuls à s'exprimer; les hémoglobines  $\tau$  et  $\epsilon$  disparaissent avant 20 semaines de grossesse pour être remplacées par de l'hémoglobine fœtale (HbF) qui perdurera après la naissance. L'HbF est formée de deux chaînes  $\alpha$  et de deux chaînes  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ); le gène  $\gamma$  est situé sur le chromosome 11. La chaîne  $\gamma$  possède de nombreuses homologies de séquence avec les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , et l'HbF est plus affine pour l'oxygène que l'HbA, permettant une bonne oxygénation du fœtus à partir d'un sang maternel peu riche en oxygène. La synthèse de la chaîne  $\beta$  commence dès la vie embryonnaire mais ne devient importante que quelques semaines avant l'accouchement; au même moment la synthèse de la chaîne  $\gamma$  chute brutalement (shift  $\gamma/\beta$ ). À la naissance, l'enfant ne porte pas encore autant d'HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) que d'HbF (20-40 % pour la première contre 60-80 % pour la seconde). Une autre chaîne est synthétisée dans la période embryonnaire, la chaîne delta ( $\delta$ ) qui va s'associer à la chaîne  $\alpha$  ( $\alpha_2\delta_2$ ), donnant l'HbA2, elle aussi oxyphorique. On en trouve moins de 0,5 % à la naissance et entre 2 et 3 % chez l'adulte (tableau I).

Les hémoglobines vont subir des modifications post-translationnelles dans le cytosol des hématies. Tout d'abord par fixation covalente non enzymatique de glucose sur des groupements aminés libres avec réarrangement d'Amadori formant de l'hémoglobine glyquée (HbA1c). On trouve bien sûr de l'hémoglobine carbamylée car c'est la forme de transport du  $\text{CO}_2$ , mais aussi d'autres formes comme des dérivés acétylés, autant de pics anormaux que l'on peut retrouver sur les chromatogrammes.

Les hémoglobines sont catabolisées dans le système réticulo-histiocytaire après lyse des hématies vieilles (en moyenne après 120 jours) dans la rate, le foie et la moelle osseuse. Les macrophages du foie, en particulier, vont libérer de l'hémoglobine qui va perdre ses molécules d'hème subissant des oxydations transformant les porphyrines en bilirubine dont une partie sera conjuguée (glucurono-

conjugaison) pour une élimination biliaire. Dans le sang, va circuler de la bilirubine conjuguée et de la bilirubine non conjuguée liée à l'albumine; il n'existe donc quasiment pas de bilirubine libre. En cas d'hémolyse importante, on retrouvera un ictère mixte, dit hémolytique. Les chaînes de globine sont dégradées dans les lysosomes, les acides aminés libérés pouvant servir à de nouvelles synthèses protéiques. Le fer libéré pourra rejoindre des formes de stockage dans le foie et la moelle, lui aussi disponible pour de nouvelles synthèses de protéines à fer, et, dans la moelle osseuse, plus directement de nouvelles molécules d'hémoglobine (recyclage du fer).

## 4. Les anomalies de synthèse des chaînes de globine

Il existe des anomalies quantitatives, les thalassémies, et des anomalies qualitatives par mutation ponctuelle dans le gène codant pour une chaîne. Les premières, les thalassémies, peuvent être de type  $\alpha$  ou  $\beta$  selon la chaîne touchée. Elles sont la cause d'anémies hémolytiques par diminution de la demi-vie des hématies pauvres en hémoglobine. Dans les thalassémies  $\alpha$ , l'absence de chaîne  $\alpha$  va conduire à la suppléer par une autre chaîne, chez le nouveau-né par le maintien de la synthèse des chaînes  $\gamma$  qui vont polymériser en  $\gamma_4$  (Hb-Bart's), chez l'adulte peu à peu par la polymérisation des chaînes  $\beta$  ( $\beta_4$  ou HbH). La nomenclature des thalassémies  $\alpha$  est basée sur le nombre de gènes atteints, puisqu'il en existe deux pour ces chaînes (A1 et A2), et selon le caractère homozygote ou hétérozygote (1 à 4 allèles touchés). Il s'agit essentiellement de délétions géniques; de très nombreuses ont été décrites. Dans les thalassémies  $\beta$ , l'absence de chaîne  $\beta$  va maintenir de l'HbF chez l'adulte par la synthèse de chaînes  $\gamma$ ; on verra aussi augmenter l'HbA2 par stimulation de la synthèse de chaînes  $\delta$  normalement peu active. La nomenclature des thalassémies  $\beta$  est basée sur le nombre d'allèles atteints du seul gène codant sur lequel plus de 100 mutations récessives ont été retrouvées. Certaines mutations amènent à aucune synthèse de chaînes  $\beta$  (mutations  $\beta^0$ ), d'autres gardent une part de la synthèse (mutations  $\beta^+$ ). Les cas de thalassémies sont classés en fonction de la sévérité des signes cliniques, en mineurs (sans signes cliniques), intermédiaires (anémie microcytaire bien supportée) et majeures (anémie hémolytique mal supportée), qui seront le plus souvent transfusées. Dans les anémies hémolytiques chroniques, on peut voir des corps de Heinz au frottis. L'anémie stimule la moelle mais, par le défaut de synthèse de l'hémoglobine, l'érythropoïèse est inefficace. Elle peut s'aggraver d'hémochromatose par thésaurisation du fer libéré, ainsi que de lésions cardiaques [3, 4].

Les anomalies qualitatives regroupent les hémoglobinoses dues à des mutations ponctuelles touchant, pour la plupart, la solubilité de l'hémoglobine, avec parfois diminution de sa stabilité. Plus de 500 mutations de la chaîne  $\beta$  ont été répertoriées, mais la plus fréquente et la plus grave est la  $\beta^6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$  responsable de la drépanocytose. Les principales mutations sont

1. voir figure 6 de l'article « Les thalassémies en 2016 »

**Tableau II : Hémoglobinoses : mutations et anomalies associées.**

| Anomalie                                 | Hb                        | Mutation/chaîne $\beta$                  |
|------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------|
| Solubilité diminuée                      | <b>S</b>                  | 6 Glu $\rightarrow$ Val                  |
|                                          | <b>C</b>                  | 6 Glu $\rightarrow$ Lys                  |
|                                          | <b>D-Punjab</b>           | 121 Glu $\rightarrow$ Gln                |
|                                          | <b>O-Arab</b>             | 121 Glu $\rightarrow$ Lys                |
| Affinité diminuée pour O <sub>2</sub>    | <b>Hope</b>               | 136 Glu $\rightarrow$ Asp                |
| Instabilité structurale (corps de Heinz) | <b>Köln, Indianapolis</b> | X                                        |
| Thalassémique                            | <b>E</b>                  | 26 Glu $\rightarrow$ Lys                 |
| Cyanose: Fe <sup>3+</sup>                | <b>Méthémoglobine</b>     | His proximale ( $\alpha$ 58, $\beta$ 63) |
| Cyanose: Fe <sup>3+</sup>                | <b>Méthémoglobine</b>     | His distale ( $\alpha$ 87, $\beta$ 92)   |

répertoriées **tableau II**. La drépanocytose est la première maladie génétique au monde ; elle l'est aussi en France par ses populations d'origines antillaises, africaines et du pourtour méditerranéen. En Afrique, elle est connue depuis fort longtemps en médecine traditionnelle ; mais il faut attendre 1910 pour voir apparaître un premier signe diagnostique, la présence d'hématies falciformes au frottis sanguin, donc par observation du sang au microscope. La transmission génétique, autosomique récessive, a été découverte en 1925, bien avant la mise en évidence de l'anomalie biochimique, en 1949, avec apparition d'une bande anormale à l'électrophorèse de l'hémoglobine (dite HbS), et enfin la découverte de la mutation génique  $\beta$ 6E/V. Cette mutation changeant un résidu d'acide aminé polaire, le glutamate, en un acide aminé apolaire et hydrophobe, la valine, va favoriser la polymérisation de l'hémoglobine dans l'hématie, ce qui est directement lié à la falciformation. Elle est favorisée par l'hypoxie ; les hématies en faucille obstruent les capillaires et créent une anémie, là encore hémolytique car ces hématies présentent une demi-vie plus courte.

## 5. Bases des méthodes d'étude

On distingue trois grands groupes de méthodes :

- 1- l'approche hématologique avec l'établissement de la numération-formule sanguine (NFS) et l'étude du frottis ;
- 2- l'étude de l'hémoglobine proprement dite avec mise en évidence de l'anomalie phénotypique ;
- 3- l'approche génétique avec mise en évidence de la mutation responsable directement ou indirectement des anomalies phénotypiques.

### 5.1. Approche hématologique

Le résultat de la NFS est indispensable à l'interprétation des résultats d'une étude de l'hémoglobine, surtout dans le cadre des thalassémies où on rencontre une anémie microcytaire. Cette dernière n'est pas spécifique car on la retrouve dans les carences en fer. La drépanocytose s'accompagne aussi d'anémie, mais les hématies falciformes ne sont visibles que sur le frottis, examen spécifique mais peu sensible. Il est

néanmoins souvent le seul accessible en médecine tropicale. On le sensibilise en ajoutant un réducteur comme le métabisulfite de sodium ou l'acide ascorbique (vitamine C). On peut aussi rechercher des corps de Heinz sur le frottis. Les réticulocytes sont fréquemment élevés car l'anémie est régénérative, bien que l'érythropoïèse soit peu efficace. La biopsie médullaire est rarement nécessaire.

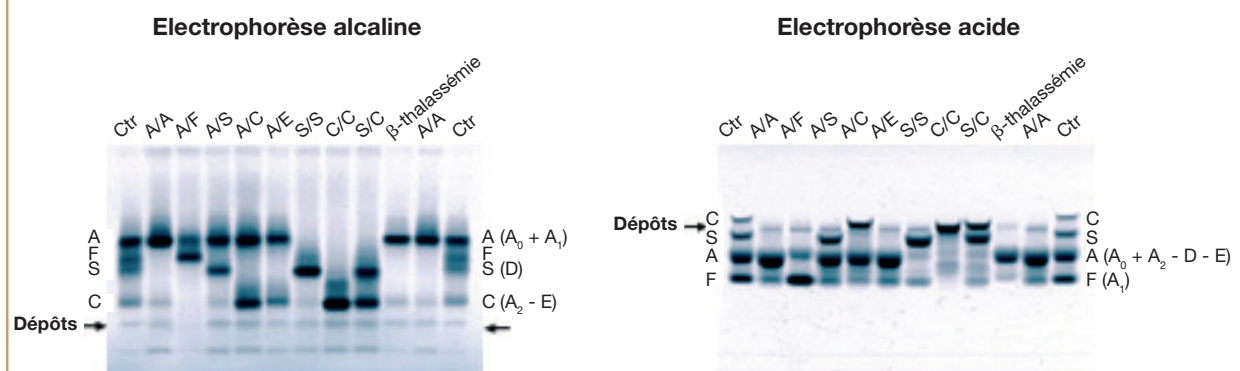
### 5.2. Étude des hémoglobines

Elle est basée sur la mise en évidence de différences de mobilité électrophorétique ou de temps de rétention dans une colonne de chromatographie. Rappelons que les hémoglobines sont des protéines amphotères riches en acides aminés basiques (Arg, Lys) et en acides aminés acides (Glu, Asp), leurs points isoélectriques (pI) étant proches de 7. Les mutations vont toucher des acides aminés de charges différentes amenant des différences de séparation par des méthodes électrophorétiques ou chromatographiques, avec modification du pI donnant des formes observables par isoélectrofocalisation. Par ailleurs, nous avons vu que physiologiquement l'absence d'HbA fonctionnelle stimule la synthèse de formes de remplacement comme l'HbF et l'HbA2 en fonction du type de déficit et de l'âge du patient. Les limites de ses méthodes séparatives sont intrinsèquement celles des différences de charges parfois minimes ; il faut ajouter les difficultés de quantification, surtout avec les méthodes électrophorétiques sur gels ; enfin, l'automatisation est limitée, même si actuellement des automates de chromatographie ou d'électrophorèse capillaire ont bien amélioré la prise en charge de ces maladies [5].

#### 5.2.1 Les méthodes électrophorétiques sur gels

On a longtemps utilisé l'électrophorèse (EP) sur gel d'acétate de cellulose puis d'agarose, en conditions alcalines (EP alcaline) en parallèle d'une autre électrophorèse menée en conditions acides (EP acide). Une autre approche est l'emploi de l'isoélectrofocalisation (IEF) sur gel. Maintenant, toutes ces méthodes sont applicables à l'électrophorèse capillaire (CE pour *capillary electrophoresis*), en électrophorèse de zone (CZE pour *capillary zone electrophoresis*) ou IEF capillaire (CIEF pour *capillary isoelectrofocusing*). En EP alcaline, les hémoglobines sont chargées négativement car le pH (8 à 9) est supérieur aux pI des Hbs (6,75 à 7,5). Actuellement, on utilise des gels d'agarose à haute résolution (HR), des tampons à pH 8,6 et une coloration des gels à l'amidoschwarz (**figure 5**). Toutes les hémoglobines vont migrer de la cathode, où elles ont été déposées, vers l'anode (migration anodique) ; elles sont freinées par le flux d'électroendosmose et migrent à une vitesse en ordre inverse des pI. L'HbA est la plus rapide (pI = 6,98), suivie par l'HbF (pI = 7,05) puis les HbS et HbD (pI  $\approx$  7,20), enfin l'HbA2 (pI = 7,42) qui migre comme beaucoup d'Hb anormales (HbC, HbE, HbO-Arab...). Les HbS et HbD portent des mutations neutralisantes (S : Glu a été remplacé par Val ; D : Glu a été remplacé par Gln), donc avec une charge négative en moins ; elles vont migrer deux fois moins vite que l'HbA. Les HbC et HbE portent des mutations apportant des charges positives (Glu remplacé par Lys), donc moins une charge négative et plus une charge positive ; ces variants vont migrer deux fois

Figure 5– Electrophorèses en gel d'agarose.



Electrophorèses en gel d'agarose, en conditions alcalines (à gauche) et acides (à droite), pour l'identification d'hémoglobines anormales (coloration à l'amido-schwarz). On voit, à gauche, le « trait drépanocytaire » (hétérozygote A/S) si fréquent en Afrique.

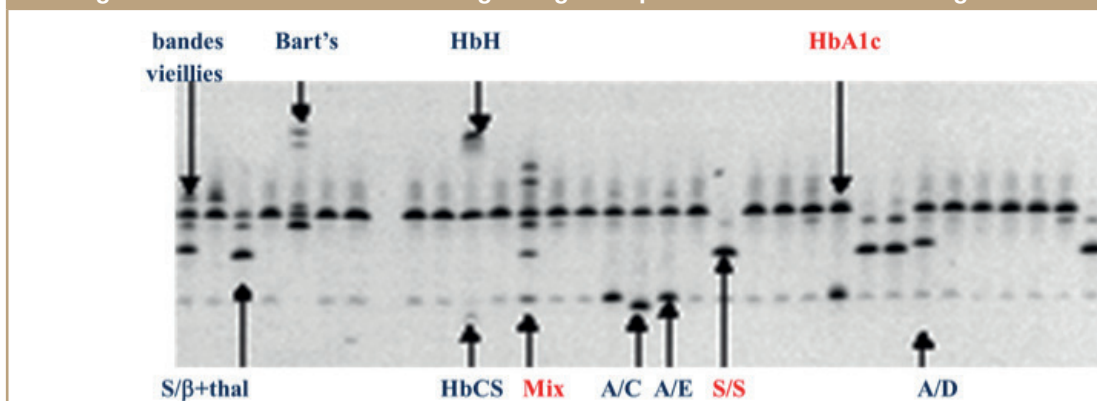
moins vite que les HbS et HbD, donc 4 fois moins que l'HbA. On distingue aisément un adulte sain (A/A), d'un enfant sain (A/F) comme d'un adulte porteur d'un trait drépanocytaire (hétérozygote A/S) ou d'un vrai drépanocytaire (homozygote S/S, double hétérozygote S/C...). On n'est néanmoins pas certain de l'identité de l'HbS car au même niveau peuvent migrer d'autres variants dont ceux du groupe D comme l'HbD-Punjab, fréquente aux Indes. Tous les variants HbS, même les traits drépanocytaires, doivent être vérifiés par une autre méthode, par exemple une EP acide. Le même problème se pose pour différencier l'HbC de l'HbE ou encore de l'HbO-Arab et de nombreux autres variants. Sur le gel d'EP alcaline, on peut quantifier par lecture densitométrique les différentes fractions, et en particulier, celles du variant, de l'HbF et de l'HbA2. Cette dernière, ordinairement très faible (< 3%) est difficilement quantifiable; la méthode chromatographique sera préférée pour cette raison essentielle. Dans le cadre de l'étude des thalassémies, l'EP permet de mettre en évidence une Hb-Bart's ou une HbH, particulièrement rapides en EP alcaline. Chez l'adulte, on peut voir l'augmentation de l'HbA2 et de l'HbF ou sa persistance.

L'EP acide apporte le diagnostic de certitude (ou presque!). Ici, les hémoglobines sont chargées positivement car la valeur du pH du tampon citrate (6,2) est inférieure à celle

des pI des Hbs. Toutes les hémoglobines vont migrer de l'anode, où elles ont été déposées, vers la cathode (migration cathodique); elles migrent dans l'ordre des pI, ou à peu près. En gel d'agarose/tampon citrate, l'HbC migre vers l'anode, emportée par le flux d'électroendosmose, l'HbS migre très peu, l'HbA est plus rapide mais migre dans un groupe contenant aussi HbA2, HbD et HbE; l'HbF est la plus rapide avec l'HbA1c. Ainsi, les Hbs qui migrent ensemble en EP alcaline (S et D, d'une part; C et E, d'autre part), migrent différemment en EP acide (S est séparée de D, et C est séparée de E).

Une autre alternative pour remplacer les deux précédentes est l'IEF; elle est même très ancienne et fait encore figure de référence. Le principe en est très simple, les Hbs vont migrer dans un gradient de pH établi en gel avec des Ampholines® (mélange d'acides aminés de divers pI); chaque Hb va s'arrêter (on dit qu'elle « focalise ») à une valeur de pH égale à son pI intrinsèque, car à cette valeur la protéine amphotère n'est plus chargée (forme zwitterion neutre, avec autant de charges positives que négatives). Les Hbs ayant des pI variés vont se retrouver à des places différentes dans le gradient de pH, Hbs que l'on peut identifier à l'aide de témoins déposés en parallèle (figure 6). On utilise des gels de polyacrylamide ou d'agarose HR, des Ampholines® et plus rarement des Immobi-

Figure 6– Isoélectrofocalisation en gel d'agarose pour l'identification d'hémoglobines anormales.



Notez le haut pouvoir résolutif de cette méthode.



lines® (ampholines immobilisées sur le gel) choisies pour former un gradient de pH entre 6 et 9. Le gradient s'établit en même temps que la focalisation électrique; il faut utiliser un générateur distribuant des voltages élevés (près de 10 000 V) car l'établissement du gradient à ampérage (I pour intensité) constant augmente la résistance (R), donc pour maintenir la puissance (P), il faut augmenter le voltage ( $U = R.I$  et  $P = U.I$ ) sinon la focalisation s'arrête ou le gradient n'est plus linéaire; et augmenter l'ampérage créerait un effet Joule trop important avec émission de chaleur allant jusqu'à brûler les électrodes, le gel et même la cuve d'électrophorèse. Mais le générateur est surveillé pour ne pas faire sauter les plombs, sinon tout est à recommencer! L'IEF est encore beaucoup utilisée pour le dépistage<sup>(2)</sup>; parfois elle est une deuxième ou une troisième méthode. L'IEF est particulièrement résolutive montrant des différences de pI de l'ordre de 0,01 U pH, donc différenciant l'HbS de l'HbD ou encore l'HbC de l'HbE; des variants plus rares peuvent aussi être détectés tant qu'on dispose de témoins adaptés.

Dans les laboratoires spécialisés, on réalise l'électrophorèse des chaînes de globine, sur gel ou en CZE, après leur séparation par traitement à l'urée et au  $\beta$ -mercapto-éthanol, un agent réducteur. Le tampon peut être acide ou alcalin.

### 5.2.2. Les méthodes d'électrophorèse capillaire

Elles ont maintenant pris une grande place avec leur développement sur les automates réalisant aussi l'électrophorèse des protéines sériques ou encore les CDT (« Carbohydre Desialylated Transferrin ») et les HbA1c. Par CZE, on peut réaliser l'EP alcaline comme l'acide, avec le même capillaire mais en changeant de tampon et de méthode; la détection se fait à 415 nm comme pour les protéines sériques (absorbance des liaisons peptidiques). La quantification des fractions mineures (HbA1c, HbA2, HbF...) est aisée et aussi bonne qu'en chromatographie, tout du moins en principe par l'estimation de la surface sous le pic. L'électrophorogramme est réalisé en 20 minutes environ<sup>(3)</sup>. Le capillaire porte l'avantage d'une faible production de chaleur et de sa bonne dispersion menant à une température homogène (thermorégulation intégrée). La quantification est aisée et la résolution élevée. Les modes de séparation sont variés. En particulier, l'IEF peut être réalisée sur capillaire (CIEF) et de nombreuses méthodes ont été proposées; mais leur robustesse ne tient guère au cours du temps, car les capillaires doivent être changés régulièrement, alourdissant la facture déjà entachée de l'investissement en matériel [6, 7]. De nouvelles adaptations devraient voir le jour, mais il faut avouer que le créneau commercial reste assez étroit. Les méthodes électrophorétiques, et tout particulièrement l'IEF et l'électrophorèse capillaire, sont très performantes et restent incontournables. Il faut néanmoins être conscient qu'elles ne peuvent pas identifier tous les variants, d'une part les variants structuraux dont les pI sont très proches des variants les plus fréquents, d'autre part les variants structuraux touchant le site de liaison de l'hème sans modifier la solubilité de l'Hb (ces variants sont méthémoglobinisant:  $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ ), enfin les variants non structuraux qui diminuent l'affinité de l'Hb pour l'O<sub>2</sub> (Ex: Hb-Hope due à la mutation  $\beta 36Glu \rightarrow Asp$ ) sans toucher sa solubilité ni même sa stabilité.

### 5.2.3. Les méthodes chromatographiques

Elles présentent une alternative, et en fait un complément, aux méthodes électrophorétiques. La meilleure méthode pour séparer et quantifier les différentes Hbs reste la chromatographie d'échange d'ions (CEI), puisqu'elle sépare les protéines selon les mêmes critères physicochimiques que l'électrophorèse: la présence de charges électriques en fonction du pH. Actuellement, on utilise surtout l'échange cationique en système de chromatographie liquide haute performance (CLHP), dans laquelle règne en fait une relative basse pression. Pour réaliser l'échange de cations, le système Varian® de chez Biorad propose une CEI sur colonne de polyaspartate, une résine chargée négativement à pH 5,8 ( $pH > pK_a$  de l'acide aspartique), pH pour lequel toutes les Hbs sont chargées positivement ( $pH < pI$ ). Les Hbs vont donc se lier à la résine par des interactions dites ioniques (ou électrostatiques régies par la loi de Coulomb). Après lavage en tampon pH 5,8, on élue les Hbs fixées en réalisant l'échange d'ions dans un gradient de concentration de citrate trisodique: l'ion  $Na^+$  entre en compétition des  $Hbs^+$  pour la liaison sur la résine acide. Les Hbs réalisant le moins de liaisons ioniques vont éluer (sortir de la colonne) les premières dans le gradient, donc pour de faibles concentrations de  $Na^+$ , alors que celles qui réalisent plus de liaisons ioniques vont éluer plus tardivement avec de plus fortes concentrations de  $Na^+$ , ainsi dans l'ordre des pI croissant (un peu comme en EP acide) on voit sortir l'HbF (et l'HbA1c), puis l'HbA (A0-A1), l'HbA2 (avec celles de la « fenêtre A2 » comme l'HbE), enfin l'HbS (avec les Hbs de la « fenêtre S » comme les HbD). Le chromatogramme est obtenu en moins de 15 minutes<sup>(4)</sup>. La quantification des fractions HbA2 et HbF est aussi bonne que celle de l'HbA1c utilisée dans le diagnostic et la prise en charge du diabète, d'où l'intérêt de la CLHP-CEI dans le diagnostic et le suivi thérapeutique des thalassémies et la mise en évidence de variants anormaux qu'il faudra confirmer par une autre méthode, donc par électrophorèse ou IEF [8, 9]. Un gradient court permet de doser l'HbS chez un drépanocytaire traité par transfusion, avec rendu du résultat en quelques heures, donc dans un cadre de semi-urgence. Dans le cadre des thalassémies, certains laboratoires qui ne font que de l'électrophorèse dosent l'HbA2 au spectrophotomètre après séparation sur micro-colonne d'échange anionique. Dans certains laboratoires spécialisés, on sépare les chaînes de globine par CLHP en phase inversée (RP-CLHP) sur colonne C4 analytique avec élution en gradient d'acétonitrile. Après mise en évidence de l'anomalie, on peut refaire une RP-CLHP sur une colonne de C18 préparative, moins résolutive mais permettant de récupérer les chaînes séparées dans un collecteur de fractions; elles seront portées au séquençage peptidique pour mettre en évidence la mutation, examen nécessaire à la découverte de nouveaux variants; il en existe plus de 500. La chaîne de globine portant la mutation est hydrolysée par la trypsine; les fragments sont séparés par RP-CLHP, là encore munie

2. voir article dans ce numéro « Dépistage néonatal de la drépanocytose ».

3. voir les figures 1 à 8 de l'article « Diagnostic biologique des hémoglobinopathies ».

4. voir les figures 1 à 8 de l'article « Diagnostic biologique des hémoglobinopathies ».

d'un collecteur de fractions pour recueillir les fragments tryptiques alors séquencés chimiquement (dégradation d'Edman) ou à l'heure actuelle par spectrométrie de masse en tandem. On voit que pour étudier un nouveau variant, il faut un laboratoire équipé lourdement en CLHP analytiques et préparatives, ainsi que de spectromètres de masse, sans compter le savoir-faire technique et la connaissance de ces maladies [5].

#### 5.2.4. D'autres méthodes biochimiques peuvent être utiles comme :

- le dosage de l'hémoglobine totale : par la méthode de Drabkin, en traitant les hématies lysées par du ferricyanure de potassium (FeCNK) et lecture à 540 nm.
- le dosage de l'HbF : par le test de résistance à la dénaturation alcaline (méthode de Betke).
- la précipitation de l'HbS ou test d'Itano : en traitant les hématies lysées par un tampon phosphate concentré et désoxygéné, seule l'HbS se polymérise et précipite.
- le test de précipitation à l'isopropanol ou à la chaleur : tests permettant de mettre en évidence une Hb instable, non identifiable par les méthodes séparatives.

On peut encore citer les méthodes d'études fonctionnelles comme la détermination des fonctions oxyphoriques des hématies, en réalisant la courbe de dissociation de l'HbO<sub>2</sub>, permettant la mise en évidence d'Hbs à affinité modifiée. Normalement, la p50 (dissociation à

50 %) est obtenue pour 27 mm de Hg ; avec l'Hb-Hope, la p50 est augmentée donc l'affinité est diminuée ; avec l'Hb-Malmö, la p50 est diminuée donc l'affinité est augmentée. Il existe aussi des méthodes de biologie cellulaire avec incorporation de thymidine tritiée et séparation des chaînes par RP-CLHP afin d'établir le rapport  $\alpha/\beta$  aidant au diagnostic des thalassémies  $\alpha$ .

#### 5.3. Étude génétique

Elle est intéressante dans 3 cas de figure :

- 1- les données phénotypiques sont insuffisantes pour établir un diagnostic (pour les  $\beta$ -thalassémies surtout) ;
- 2- le diagnostic prénatal de drépanocytose ;
- 3- le diagnostic prénatal de l' $\alpha$ -thalassémie de type 4 et de la  $\beta$ -thalassémie majeure, en connaissance de la mutation ou de la délétion chez les parents. Les résultats ne sont pas toujours couronnés de succès, et les corrélations phénotype/génotype ne sont pas toujours bonnes. Parmi les techniques utilisées, on peut citer le « reverse dot blot », la PCR « classique » ou Multiplex, la PCR digitale, le séquençage type Sanger ou le NGS (« new generation sequencing »). Toutes ces méthodes et leur utilisation dans le diagnostic des maladies de l'hémoglobine sont décrites dans l'article « Génétique des maladies de l'hémoglobine » [10].

**Conflits d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

## Références

- [1] Lehninger : Principles of Biochemistry, Sixth Edition - David L. Nelson, Michael M. Cox - Macmillan, Higher Education, International Edition, H. Freeman and Company - ISBN-13 : 978-1-4641-0962-1.
- [2] Introduction to protein structure, Second Edition - Carl Branden, John Tooze - Garland - ISBN : 0-8153-2305-0.
- [3] NHS Sickle and Thalassaemia, Handbook for laboratories, 2012. [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/398702/LabHandbook2012Edition3v2.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/398702/LabHandbook2012Edition3v2.pdf)
- [4] HbVar: A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemsias. <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>
- [5] Wajcman H, Moradkhani K. Abnormal haemoglobins: detection & characterization. Indian J Med Res 2011 ;134(4):538-546.

- [6] Mario N, Baudin B, Bruneel A, Janssens J, Vaubourdolle M. Capillary electrophoresis for the diagnosis of congenital hemoglobinopathies. Clin Chem 1999 ;45(2):285-288.
- [7] Borbely N, Phelan L, Szydio et al. Capillary zone electrophoresis for haemoglobinopathy diagnosis. J Clin Pathol 2013 ;66(1):29-39.
- [8] Riou J, Godart C, Hurtel D et al. Cation exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. Clin Chem 1997 ;43(1):34-39.
- [9] Mario N, Baudin B, Aussel C, Giboudeau J. Capillary isoelectric focusing and high-performance cation-exchange chromatography compared for qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants. Clin Chem 1997 ;43(11):2137-2142.
- [10] Couque N, De Montalembert M. Diagnostic d'une hémoglobinopathie. Feuilles de Biologie 2013 ;311:5-18.

# Diagnostic biologique des hémoglobinopathies

Nathalie Mario<sup>a</sup>, Nadia Sala<sup>a</sup>

## RÉSUMÉ

Les hémoglobinopathies regroupent les thalassémies liées à un défaut de synthèse d'une des chaînes de globine et les pathologies dues à la synthèse d'un variant à solubilité, stabilité ou affinité pour l'oxygène altérée. Le variant le plus significatif est l'hémoglobine S qui à l'état homozygote ou sous forme de diverses hétérozygoties composites (S/C, S/E, S/D-Punjab, S/Lepore, S/ $\beta$ -thalassémie) est responsable des syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) ou thalassémiques. En France, outre un dépistage néonatal ciblé des SDM regroupé dans 6 centres, un dépistage chez les femmes enceintes est couramment pratiqué et permet d'identifier les couples à risque. Devant une anémie hémolytique ou une microcytose hypochrome sans carence martiale, une recherche d'hémoglobinopathie est souvent effectuée. La chromatographie liquide haute performance d'échange d'ions ou l'électrophorèse capillaire permettent un dosage fiable des hémoglobines, en particulier A2 et F. Leur utilisation conjointe permet de détecter et d'identifier les principaux variants pathologiques. Le diagnostic étayé par une conclusion utilise les résultats de ces deux techniques et des paramètres érythrocytaires. Le recours à un laboratoire spécialisé pour le typage moléculaire est nécessaire pour le diagnostic de certaines thalassémies et pour l'identification du défaut moléculaire et des facteurs de pronostic des SDM.

**Chromatographie liquide haute performance – drépanocytose – électrophorèse capillaire – hémoglobinopathie – Thalassémie.**

## 1. Introduction

Selon les données de l'organisation mondiale de la santé, 7 % de la population mondiale est porteuse d'un gène anormal de globine et dans certaines régions du monde jusqu'à 1 % des nouveau-nés sont atteints d'une pathologie de l'hémoglobine [1]. Ces pathologies sont surtout répandues dans les régions tropicales et se sont étendues à la majorité des pays du fait des migrations de populations.

Parmi plus de 1600 mutants de l'hémoglobine répertoriés [2], plus de 1200 sont responsables de la synthèse d'un variant anormal. Un petit nombre de ces variants est cliniquement significatif en raison d'une anomalie de solubilité, de stabilité ou de capacité à transporter ou délivrer l'oxygène du variant. Il s'agit des hémoglobines (Hb) S, C, E, D-Punjab, O-Arab et Lepore qui doivent être reconnues par les laboratoires. Les rares cas d'Hb à affinité

modifiée pour l'oxygène, de méthémoglobines et d'hémoglobines instables doivent être repérés. Parallèlement, près de 500 mutants sont responsables d'une anomalie quantitative de synthèse ou thalassémie. L'ensemble des thalassémies doit être repéré, essentiellement par les dosages des HbA2 et HbF couplés à l'interprétation des paramètres érythrocytaires.

## 2. Circonstances de diagnostic

La prévalence des hémoglobinopathies dans l'ensemble de la population en France est inconnue mais en constante augmentation et le nombre de porteurs d'une anomalie croît également, en particulier en Ile-de-France. De nombreuses maternités proposent un dépistage anténatal par étude de l'hémoglobine chez les femmes originaires d'une région à risque en début de grossesse afin d'évaluer le risque pour l'enfant à naître (**tableau I**). Les examens sont réalisés par l'ensemble des laboratoires proposant le diagnostic d'une hémoglobinopathie dont le nombre est d'environ 150 en extrapolant à partir du nombre de participants aux évaluations externes de la qualité

## SUMMARY

### Laboratory diagnosis of hemoglobin disorder

Hemoglobin disorders included thalassemias due to a reduced production of globin chains and diseases due to a hemoglobin variant with abnormal solubility, stability or oxygen delivery. Hemoglobin S is the most frequent clinically severe variant, involved at homozygous or various compound heterozygous states (S/C, S/E, S/D-Punjab, S/Lepore, S/ $\beta$ -thalassemia) in sickle cell disease (SCD) and thalassemias. In France, targeted newborn screening to identify SCD is performed by 6 laboratories and screening in pregnant women is common to identify couples at risk. Face to hemolytic or anemia or microcytosis and hypochromia without iron deficiency, laboratory diagnosis of hemoglobinopathies is requested. Cation-exchange high performance chromatography or capillary electrophoresis are indicated for quantification of hemoglobins, especially A2 and F. Identification of common clinically significant hemoglobin variants is possible by combination of these two methods. Result interpretation is done with red cell indices and a conclusion is reported with laboratory data. Molecular testing in reference laboratory is mandatory for diagnosis of complex thalassemias and characterization of sickling disorders.

**High performance liquid chromatography – sickle cell disease – capillary electrophoresis – hemoglobinopathy – thalassemia .**

<sup>a</sup> Hôpital Saint-Antoine HUEP, APHP, Paris  
Service Biochimie  
184, rue du Faubourg Saint-Antoine - 75012 PARIS

\*Correspondance :  
nathalie.mario@aphp.fr

article reçu le 21 janvier, accepté le 2 février 2016

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

**Tableau I – Régions à risque de syndrome drépanocytaire majeur.**

Départements français d'outre-mer : Antilles, Guyane, la Réunion, Mayotte

Tous les pays d'Afrique subsaharienne et le Cap-Vert

Amérique du Sud (Brésil), Noirs d'Amérique du Nord

Inde, Océan Indien, Madagascar, Île Maurice, Comores

Afrique du Nord : Algérie, Tunisie, Maroc

Italie du Sud, Sicile, Grèce, Turquie

Moyen-Orient : Liban, Syrie, Arabie Saoudite, Yémen, Oman

(167 pour le contrôle ANSM en 2013 et 143 pour les contrôles Probioqual en 2015). Une liste de commentaires conclusifs précis en fonction des anomalies maternelles, incluant la demande d'étude de l'Hb en parallèle d'une numération sanguine chez le père, devrait être formalisée en France afin d'homogénéiser les pratiques et d'améliorer la compréhension des résultats par les prescripteurs, comme cela existe dans d'autres pays européens [3,4]. Il existe en France, un programme de dépistage des syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) à la naissance coordonné par l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE) qui est responsable de tous les dépistages néonataux. On regroupe sous le terme de SDM les homozygotes S/S, les hétérozygotes composites S/ $\beta$ -thalassémie, S/C, S/E, S/D-Punjab, S/O-Arab, S/Lepore et les hétérozygotes AS-Antilles. Le programme de dépistage des SDM en métropole est ciblé chez les enfants dont les parents sont originaires d'une région à risque (**tableau I**). Le programme est systématique en outre-mer. Les examens sont réalisés par 6 centres répartis sur le territoire. Les résultats globaux du rapport d'activité 2014 de l'AFDPHE [5] font apparaître que les SDM sont les maladies héréditaires les plus fréquentes en France avec 485 naissances d'enfants atteints. Les enfants atteints d'un SDM se trouvent essentiellement en Ile-de-France (245 enfants) et l'incidence régionale est de 1/755 naissances. Depuis 2006, l'incidence des SDM varie peu mais le pourcentage d'enfants ciblés est passé de 27 % à 37 % en métropole. Le dépistage a également repéré 11 cas de  $\beta$ -thalassémie majeure en 2014. Chez 12 150 nouveau-nés, une hémoglobine anormale à l'état hétérozygote a été retrouvée, le plus souvent de l'Hb S. Les familles de ces enfants porteurs sains doivent être informées lors d'une consultation et un diagnostic devrait leur être proposé afin d'identifier les couples à risque.

Le diagnostic d'une hémoglobinopathie peut également se réaliser devant une anomalie clinico-biologique évocatrice. L'anémie chronique est le signe clinique le plus souvent à l'origine de la demande ; elle est retrouvée dans les thalassémies intermédiaires et majeures, les SDM et en cas d'Hb instable. Des symptômes douloureux évocateurs de SDM sont parfois à l'origine de la demande et plus rarement une polyglobulie (Hb hyper-affines) ou une cyanose (méthémoglobines). Certaines anomalies

purement biologiques comme une hémolyse ou une microcytose peuvent également faire rechercher une anomalie de l'Hb [7].

La découverte fortuite d'une fraction anormale lors du dosage de l'HbA1c par chromatographie liquide haute performance ou électrophorèse capillaire peut conduire le laboratoire à l'identifier.

## 3. Méthodes de diagnostic

### 3.1. Importance du pré-analytique

Le prélèvement de choix pour l'étude de l'Hb est un échantillon de sang frais prélevé sur EDTA. L'échantillon peut être conservé 7 jours à 2-8 °C maximum mais la recherche des hémoglobines instables doit impérativement se faire sur sang frais.

Une transfusion érythrocytaire récente peut fausser l'interprétation des résultats et doit absolument être connue du biologiste. L'origine géographique du patient doit être connue du biologiste pour une interprétation satisfaisante. L'âge du patient est un élément important à prendre en compte pour le diagnostic d'une hémoglobinopathie. Le profil adulte est atteint à partir de 2 ans et le diagnostic des  $\beta$ -thalassémies hétérozygotes est difficile avant cet âge. À l'inverse le diagnostic des  $\alpha$ -thalassémies est plus aisé en période néonatale, l'Hb-Bart's (tétramère  $\gamma_4$ ) étant présente dès qu'un gène alpha est touché.

Le biologiste doit impérativement disposer des données de la numération érythrocytaire (Hb, VGM, TCMH) pour savoir si le patient est atteint d'une anémie et s'il présente une microcytose en vue de l'interprétation des résultats. La connaissance du statut martial (ferritine), permettra une interprétation pertinente, en particulier chez les femmes enceintes pour lesquelles la carence martiale est fréquente. La connaissance du statut en vitamine B12 et folates est parfois nécessaire pour une interprétation complète [6].

### 3.2. Choix des techniques

Selon la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM), la recherche d'une anomalie de l'Hb (acte 1120, B120) doit être faite par au moins une technique d'électrophorèse et de deux autres tests adaptés selon les besoins pour un résultat diagnostique d'orientation. La NABM précise qu'un commentaire et une conclusion accompagnent le compte-rendu.

Parmi les 3 techniques utilisées, l'une doit être quantitative afin de pouvoir doser précisément les HbA2 et HbF. Seules la chromatographie liquide haute performance d'échange cationique (CLHP) et l'électrophorèse capillaire (ECAP) sont acceptables pour une quantification, permettent la séparation de nombreux mutants et sont entièrement automatisées [7,8].

La CLHP d'échange cationique associée à une technique d'électrophorèse est une stratégie largement répandue. L'électrophorèse capillaire bien que d'introduction récente est de plus en plus utilisée. Elle est en effet automatisée, plus résolutive que l'électrophorèse alcaline en gel, permettant la séparation des HbD et G de l'HbS et la séparation de l'HbC de l'HbE et de l'HbA2. Les électrophorégrammes obtenus sont plus simples à



interpréter que les chromatogrammes du fait de l'absence de séparation des formes natives et modifiées d'Hb. L'isoélectrofocalisation ou l'électrophorèse à pH alcalin peuvent également être utilisées en première intention. La 3<sup>e</sup> technique peut être choisie en fonction des résultats obtenus avec les deux précédentes ou systématisée. Le plus souvent les laboratoires effectuent systématiquement une technique électrophorétique différente de la première utilisée. Cette stratégie ne permettra de mettre en évidence que les variants dont la charge est différente de celles des Hb normales. La confirmation des HbS par un test de solubilité (test d'Itano ou autre) qui sera positif si le taux d'HbS dans le prélèvement est > 20 % est également répandue. Dans le cadre du dépistage chez les femmes enceintes, la numération sanguine nécessaire à l'interprétation des résultats n'est pas toujours prescrite et sa réalisation comme 3<sup>e</sup> technique permettrait au biologiste une interprétation plus pertinente que la réalisation d'une technique électrophorétique supplémentaire.

Lorsque l'étude de l'Hb est demandée en raison d'une anomalie clinico-biologique, certains tests physico-chimiques ciblés seront plus informatifs qu'une seconde technique électrophorétique. Ainsi la recherche de corps de Heinz par coloration d'un frottis au bleu de crésyl brillant est positive en cas d'HbH (tétramère  $\beta_4$ ) et d'hémoglobine instable. Une suspicion d'Hb hyper-affine évoquée devant une polyglobulie peut être détectée par le passage de l'échantillon sur un analyseur de gaz du sang mesurant la p50. Une suspicion de méthémoglobine évoquée devant une cyanose chronique peut être détectée par passage de l'échantillon sur un analyseur de gaz du sang disposant d'un co-oxymètre ou par analyse spectrophotométrique classique. Une suspicion d'Hb instable évoquée devant une anémie hémolytique chronique d'étiologie inconnue pourra être détectée par un test de stabilité à l'isopropanol réalisé sur rendez-vous dans les 6 heures suivant le prélèvement. L'identification moléculaire des rares Hb hyper-affines, méthémoglobines, et Hb instables sera ensuite confiée à un laboratoire de référence du réseau « pathologie héréditaire de l'érythrocyte » [9].

### 3.3. Performance du dosage d'HbA2

Le dosage de l'HbA2 est classiquement utilisé pour identifier les porteurs de  $\beta$ -thalassémies hétérozygotes. Le diagnostic est aisé dans les formes typiques où l'HbA2 est nettement élevée (5 à 7 %) et associée à une microcytose et une hypochromie mais plus difficile lorsque l'HbA2 est modérément augmentée. À l'inverse les valeurs d'HbA2 sont classiquement diminuées au cours des  $\alpha$ -thalassémies [10].

L'erreur totale acceptable du dosage de l'HbA2 évaluée à partir des réponses d'un groupe d'expert à des cas cliniques fictifs est < 9 % et en se basant sur les besoins cliniques elle est < 7 % [11]. Une étude de la variabilité biologique de l'HbA2, réalisée chez 17 sujets sains, a montré une très faible variabilité intra- et interindividuelle. Les objectifs analytiques qui en découlent ont été intégrés à la version 2014 de la base de données de C. Ricos disponible à l'adresse

<https://www.westgard.com/biodatabase1.htm> et sont très restrictifs. Ces objectifs sont un CV de fidélité intermédiaire acceptable < 0,5 % (souhaitable < 0,35 %), un biais acceptable < 2,9 % (souhaitable < 1,93 %) et une erreur totale acceptable < 4,5 % (souhaitable < 2,51 %) [11]. Cependant de telles performances sont aujourd'hui inatteignables avec les différents systèmes analytiques de CLHP ou d'ECAP commercialisés avec lesquels les CV de fidélité intermédiaire sont compris entre 1,6 et 2,8 % pour une Hb A2 < 3,5 % [12]. Le comité international de standardisation en hématologie a défini en 2012 une limite de CV de fidélité intermédiaire à 2 % [13]. Une meilleure standardisation du dosage de l'HbA2 est également nécessaire car il existe des biais importants en fonction des méthodes de dosage [12,13].

Dans notre laboratoire, l'HbA2 est dosé par CLHP sur un Variant II Bio-Rad (Dual Kit). Le CV de fidélité intermédiaire de l'année 2015 était de 1,8 % pour une valeur normale (3 %) ou élevée (5,6 %) (contrôles Lyphochek HbA2, Bio-Rad, lot 34410, n = 167 par niveau), conforme aux recommandations du comité international de standardisation en hématologie. Les résultats des évaluations externes de la qualité montrent qu'il existe un biais important (> 10 %) entre les techniques de CLHP et d'ECAP (programme ELHB Probioqual). Les valeurs usuelles et les seuils habituellement utilisés sont ceux de la CLHP et doivent être adaptés par les laboratoires quantifiant l'HbA2 par ECAP.

### 3.4. Performance du dosage d'Hb F

Il est important de quantifier l'HbF pour le diagnostic des persistances héréditaires en HbF (PHHF), des  $\beta$ - et  $\delta\beta$ -thalassémies, ainsi que dans les SDM, au moment du diagnostic et pour le suivi du traitement par hydroxycarbamide (Hydroxyurée) [14].

Il n'existe pas à ce jour d'objectifs analytiques définis à partir de la variabilité biologique. Le comité international de standardisation en hématologie a défini en 2012 une limite de CV de fidélité intermédiaire à 5 % pour le dosage d'HbF [13] compatible avec la plupart des systèmes analytiques de CLHP ou ECAP commercialisés avec lesquels les CV sont compris entre 1,2 et 2,6 % pour une HbF à 3,0 % [15].

Dans notre laboratoire, l'HbF est dosée par CLHP sur un Variant II Bio-rad (Dual Kit). Le CV de fidélité intermédiaire de l'année 2015 était de 1,5 % pour une Hb F à 2,5 % et de 1,8 % pour une HbF à 10,5 % (contrôles Lyphochek HbA2, Bio-Rad, lot 34410, n = 167 par niveau), conforme aux recommandations du comité international de standardisation en hématologie. Les résultats des évaluations externes de la qualité montrent une absence de biais entre les techniques de CLHP et d'ECAP pour les valeurs d'Hb F > 1 % (programme ELHB Probioqual).

## 4. Interprétation des résultats

Tous les laboratoires effectuant l'étude de l'hémoglobine, que ce soit en vue du diagnostic d'une hémoglobinopathie cliniquement significative ou dans le but de dépister des porteurs en prévention, doivent reconnaître les anomalies responsables à l'état homozygote ou hétérozygote composite de SDM ou de thalassémies intermédiaires et

**Tableau II – Liste des anomalies de l'Hb devant être mise en évidence par les laboratoires (adapté de [3]).**

| Hémoglobinoopathies cliniquement significatives (expression clinique)                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Homozygote S/S (SDM)                                                                  |
| Hétérozygote composite S/C (SDM)                                                      |
| Hétérozygote composite S/D-Punjab (SDM)                                               |
| Hétérozygote composite S/E (SDM atténué)                                              |
| Hétérozygote composite S/Lepore (SDM)                                                 |
| Hétérozygote composite S/O-Arab (SDM)                                                 |
| Hétérozygote composite S/β thalassémie (SDM)                                          |
| Hétérozygote composite S/β+ thalassémie (SDM atténué)                                 |
| Hétérozygote composite S/δβ thalassémie (SDM)                                         |
| Homozygote β0/β0 thalassémie (thalassémie majeure)                                    |
| Hétérozygote composite β0/β+ ou β+/β+ (thalassémie intermédiaire)                     |
| Hétérozygote composite Lepore/β0 ou Lepore/β+ thalassémie (thalassémie intermédiaire) |
| Hétérozygote composite E/β0 ou E/β+ thalassémie (thalassémie intermédiaire)           |
| Hémoglobinoase H - -/- α (thalassémie intermédiaire)                                  |
| Porteurs asymptomatiques                                                              |
| Hétérozygote A/S                                                                      |
| Hétérozygote A/C                                                                      |
| Hétérozygote A/D-Punjab                                                               |
| Hétérozygote A/E                                                                      |
| Hétérozygote A/Lepore                                                                 |
| Hétérozygote A/O-Arab                                                                 |
| Hétérozygote β0 ou β+ thalassémie                                                     |
| Hétérozygote δβ thalassémie                                                           |
| Hétérozygote α0 thalassémie - -/αα                                                    |
| Persistance héréditaire en HbF                                                        |
| Hétérozygotes composites ou homozygotes des porteurs décrits ci-dessus                |

**Tableau III – Valeurs d'HbF et d'HbA2 (minimum-maximum) chez les nourrissons normaux de la naissance à 2 ans (adapté de ref [14]).**

| Age (mois)     | n    | HbF %   | HbA2 %  |
|----------------|------|---------|---------|
| à la naissance | 1250 | 58-84   | 0,0-1,0 |
| 1-3            | 29   | 29-61   | 0,5-1,5 |
| 3-5            | 85   | 9-40    | 1,3-2,1 |
| 5-8            | 50   | 3-15    | 1,6-2,6 |
| 8-12           | 89   | 1-10    | 1,8-2,9 |
| 12-23          | 222  | 0,5-3,0 | 1,9-3,0 |
| 24             | 3550 | 0,1-1,2 | 2,0-3,0 |

majeures (**tableau II**). Dès que l'une de ces anomalies est mise en évidence, il est important d'indiquer sur le compte rendu qu'une enquête familiale est souhaitable et si le patient est une femme enceinte ou qui prévoit une grossesse que l'étude de l'Hb doit impérativement être faite chez le conjoint. Lorsque l'anomalie détectée est responsable d'une pathologie, il est important d'indiquer sur le compte-rendu qu'une consultation médicale spécialisée s'impose et qu'une étude génotypique de l'Hb doit être entreprise pour préciser le défaut moléculaire et évaluer la gravité.

Il est souhaitable que les laboratoires puissent également mettre en évidence, lorsque le contexte clinique est évocateur, les rares hémoglobines instables, hyper-affines et les méthémoglobines avant recours à un laboratoire spécialisé. Les interprétations proposées dans cet article reprennent les arbres décisionnels du réseau DHOS pathologie héréditaire de l'érythrocyte [9] complétés par ceux fournis dans le manuel à l'attention des laboratoires du « *National Health Survey, screening programme sickle cell and thalassemia* » [3]. Les résultats quantitatifs sont ceux de la CLHP et ne sont interprétables qu'en l'absence de transfusion récente (> 3 mois). Les résultats qualitatifs conjoints de la CLHP (Variant II Bio-Rad, Dual Kit) et de l'électrophorèse capillaire (Capillarys II Flex-piercing Sebia, kit hémoglobine) sont utilisés pour le diagnostic des variants anormaux.

## 4.1. Profils normaux

Le profil normal de l'adulte met en évidence de l'HbA majoritaire, de l'HbA2 (2,2 à 3,4 % en CLHP, Variant II Bio-Rad, Dual Kit), éventuellement des traces d'HbF (< 1 %). En CLHP, l'HbA0 native est séparée de ses différentes formes modifiées (glyquée, acétylée, ...) tandis qu'en ECAP c'est l'ensemble de l'HbA qui est mesurée. Le laboratoire peut s'il le souhaite rendre l'HbA0 mesurée en CLHP, un calcul d'HbA par soustraction ou l'HbA mesurée en ECAP si celle-ci est utilisée comme la technique quantitative pour l'étude de l'Hb (**figure 1A**). L'étude est considérée comme normale en l'absence de microcytose et d'hypochromie. S'il existe une microcytose et/ou une hypochromie, avec ou sans anémie, il est important de connaître le statut martial du sujet, avec au minimum la ferritine. En cas de carence martiale, la correction par un traitement en fer est nécessaire avant de renouveler l'étude de l'Hb.

Le profil normal du nouveau-né met en évidence de l'HbF majoritaire, de l'HbA et des traces d'HbA2 (< 0,5 %) (**figure 1B**). La valeur de l'HbF à la naissance est d'autant plus élevée que l'enfant est prématuré, à l'inverse de l'HbA. Ainsi l'HbA0 mesurée en CLHP (Variant NBS Bio-Rad), est de 4 à 8 % à 26 semaines, de 5 à 10 % à 30 semaines, de 8 à 18 % à 36 semaines et de 12 à 30 % à 40 semaines [3]. Après la naissance, l'Hb F continue à diminuer tandis que l'HbA et l'HbA2 augmentent pour atteindre les valeurs de l'adulte à 2 ans (**tableau III**).

## 4.2. Thalassémies et persistances héréditaires en Hb F (PHHF)

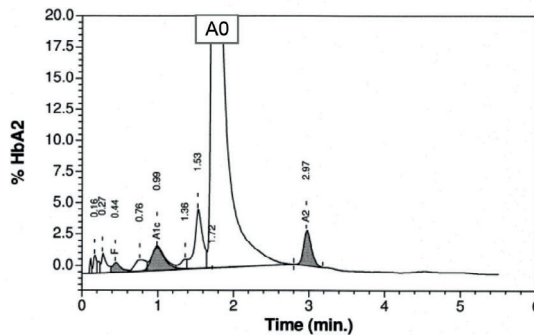
Les thalassémies sont dues à un défaut partiel ou total de synthèse d'une des chaînes de globine conduisant à un déséquilibre entre les chaînes avec un excès de chaînes non appariées conduisant à des anomalies de l'érythropoïèse. Toutes les chaînes peuvent être touchées mais seules les α- et β-thalassémies sont cliniquement significatives.

Figure 1- Profils normaux.

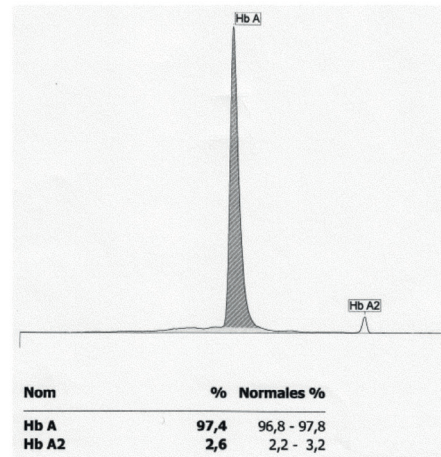
 CLHP réalisée sur Variant II Bio-Rad  
(Dual Kit)

HbF = 0.8 %  
 HbA1c (NGSP) = 4.9 %  
 HbA2 = 2.8 %  
 HbA1c (IFCC) = 30 mmol/mol

Analysis comments:

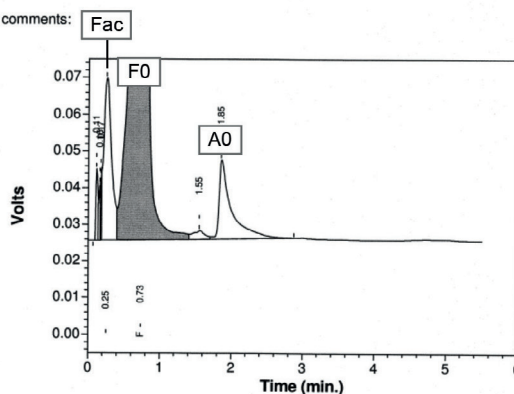


A

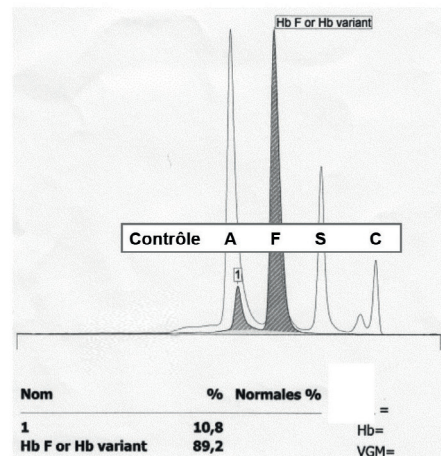
 ECAP réalisée sur Capillarys 2 Flex-piercing Sebia  
(Kit hémoglobine)


HbF = 79.8\* %  
 HbA1c (NGSP) = %  
 HbA2 = %  
 HbA1c (IFCC) = mmol/mol

Analysis comments:



B



A- Adulte normal: Le pic principal en CLHP correspond à l'HbA native (A0).

B- Nouveau-né normal: l'HbA2 est indétectable avec les deux techniques; l'HbF mesurée en CLHP correspond en fait à l'HbF native (F0), l'HbF acétylée (Fac) est éluée juste devant; en ECAP, la superposition avec un contrôle AFSC permet d'identifier le pic 1 comme l'HbA.

Sur le plan clinique, on distingue les thalassémies majeures responsables d'une anémie microcytaire hypochrome sévère transfusion dépendante, les thalassémies intermédiaires où l'anémie est plus modérée et les thalassémies mineures caractérisées par une microcytose et une hypochromie sans anémie.

#### 4.2.1. Béta-thalassémies

Les  $\beta$ -thalassémies sont fréquentes sur le pourtour du bassin méditerranéen et en Asie. La plupart des  $\beta$ -thalassémies sont dues à des mutations ponctuelles pour lesquelles l'allèle touché peut être responsable de l'absence de synthèse de chaîne  $\beta$  définissant les  $\beta^0$ -thalassémies ou à une diminution de synthèse définissant les  $\beta^+$ -thalassémies [16]. Le diagnostic biologique repose sur l'interprétation des paramètres érythrocytaires et le dosage des HbA2 et F. La  $\beta$ -thalassémie hétérozygote ou trait  $\beta$ -thalassémique est caractérisée par une microcytose, une hypochromie, fréquemment une pseudo-polyglobulie, une augmentation de l'HbA2 et éventuellement une discrète augmentation de

l'HbF, en CLHP ou ECAP (figure 2A). Le diagnostic est aisé, à partir de 2 ans, devant une HbA2 comprise entre 4 % et 8 % mais plus difficile lorsque l'HbA2 est discrètement augmentée (3,5 à 3,9 %). En l'absence de microcytose, il faudra alors rechercher une autre cause d'augmentation de l'HbA2 : hyperthyroïdie, carence en folates et vitamine B12, traitement antirétroviral. Si une microcytose existe, les facteurs pouvant diminuer l'HbA2 doivent être évoqués : carence martiale, diabète très déséquilibré,  $\delta\beta$ -thalassémie [10]. La carence martiale est très fréquente chez la femme enceinte et lors du dépistage au cours de la grossesse, le laboratoire doit conseiller de pratiquer une étude de l'Hb chez le conjoint devant une HbA2 > 3,4 %, afin de prévenir tout risque pour l'enfant à naître. Une HbA2 > 8 % ne peut se rencontrer et évoque l'existence d'un mutant anormal. Une  $\beta$ -thalassémie intermédiaire ou majeure est évoquée devant une anémie (Hb < 10 g/dL) microcytaire hypochrome. Le diagnostic de  $\beta$ -thalassémie majeure ( $\beta^0$ -thalassémie homozygote) peut se faire à la naissance à l'occasion du dépistage néonatal de la drépanocytose devant l'absence



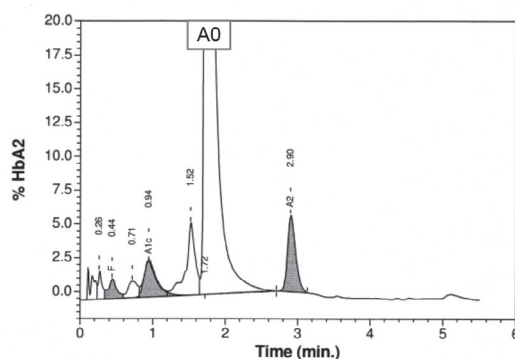
Figure 2 – Profils de thalassémies.

CLHP réalisée sur Variant II Bio-Rad (Dual Kit)

HbF = 1.29 %  
HbA1c (NGSP) = 5.68 %  
HbA2 = 5.67 %

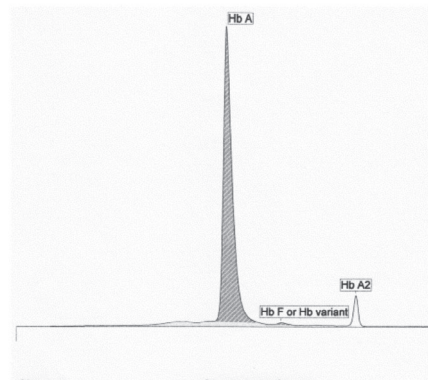
HbA1c (IFCC) = 39 mmol/mol

Analysis comments:



A

ECAP réalisée sur Capillarys 2 Flex-piercing Sebia (Kit hémoglobine)

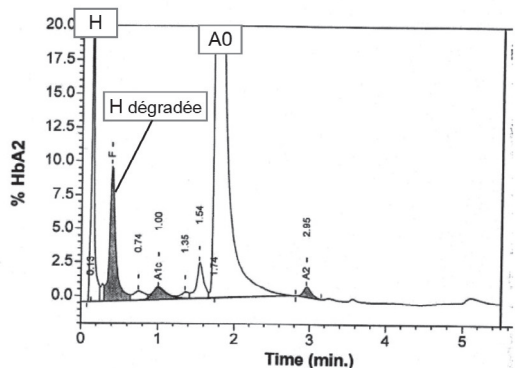


| Nom                | %    | Normales %  |
|--------------------|------|-------------|
| Hb A               | 94,1 | 96,8 - 97,8 |
| Hb F or Hb variant | 0,7  | < 0,5       |
| Hb A2              | 5,2  | 2,2 - 3,2   |

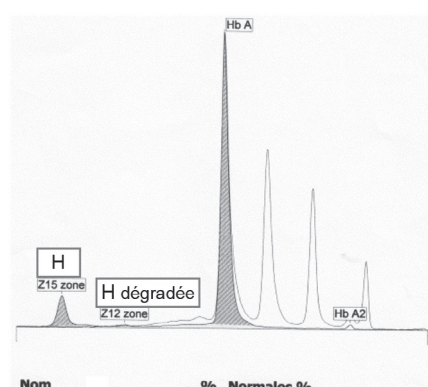
HbF = 8.2\* %  
HbA1c (NGSP) = 3.4\* %  
HbA2 = 0.7\* %

HbA1c (IFCC) = 14\* mmol/mol

Analysis comments:



B



| Nom        | %    | Normales % |
|------------|------|------------|
| Z15 zone H | 9,9  |            |
| Z12 zone   | 0,6  |            |
| Hb A       | 88,7 |            |
| Hb A2      | 0,8  |            |

**A-** Adulte porteur d'une  $\beta$ -thalassémie hétérozygote: Le biais décrit sur les contrôles de qualité pour l'HbA2 entre CLHP et ECAP est retrouvé chez les patients (dans l'exemple, A2 = 5,67 % en CLHP et A2 = 5,5 % en ECAP).

**B-** Adulte atteint d'hémoglobinoïde H ( $\alpha$ -thalassémie): l'HbH est éluée précocement en CLHP et peut être confondue avec un artefact; l'HbH dégradée est identifiée à tort par le logiciel comme de l'H F en CLHP; l'HbH migre en zone 15 et l'HbH dégradée en zone 12 en ECAP.

de fraction anormale et d'HbA. À partir de 6 mois, l'anémie sévère sera constituée: Hb < 7 g/dL, VGM entre 50 et 70 fl, TCMH entre 12 et 20 pg avec hépato-splénomégalie. Le diagnostic de  $\beta$ -thalassémie intermédiaire (hétérozygotie composite  $\beta^0/\beta^+$  ou  $\beta^+/\beta^+$ ) est plus tardif et repose sur une augmentation d'HbA2 et d'HbF associée à une anémie (Hb < 10 g/dL) microcytaire (VGM < 75 fl) hypochrome (TCMH < 25 pg). Le frottis sanguin montre des anomalies d'autant plus marquées que la forme est sévère avec des hématies microcytaires et hypochromes, une anisocytose, une poikilocytose, des hématies à ponctuations basophiles et des érythroblastes circulants [17]. Une élévation de l'HbA2 et de l'HbF sans anémie ni microcytose franche (VGM > 75 fl) doit faire évoquer une association  $\beta$ -thalassémie/PHHF asymptomatique. L'étude familiale et la caractérisation moléculaire des anomalies est indispensable pour les  $\beta$ -thalassémies majeures et intermédiaires [16]. Une augmentation isolée de l'HbF est observée au cours de la grossesse (augmentation physiologique de l'HbF, maxi-

male au 2<sup>e</sup> trimestre et pouvant aller jusqu'à 5 % d'HbF), des érythropoïèses de stress (phase régénérative des aplasies médullaires et des anémies, traitement à l'érythropoïétine, myélodysplasies), de l'hyperthyroïdie, de l'anémie de Fanconi, des PHHF asymptomatiques, et des  $\delta\beta$ -thalassémies [15].

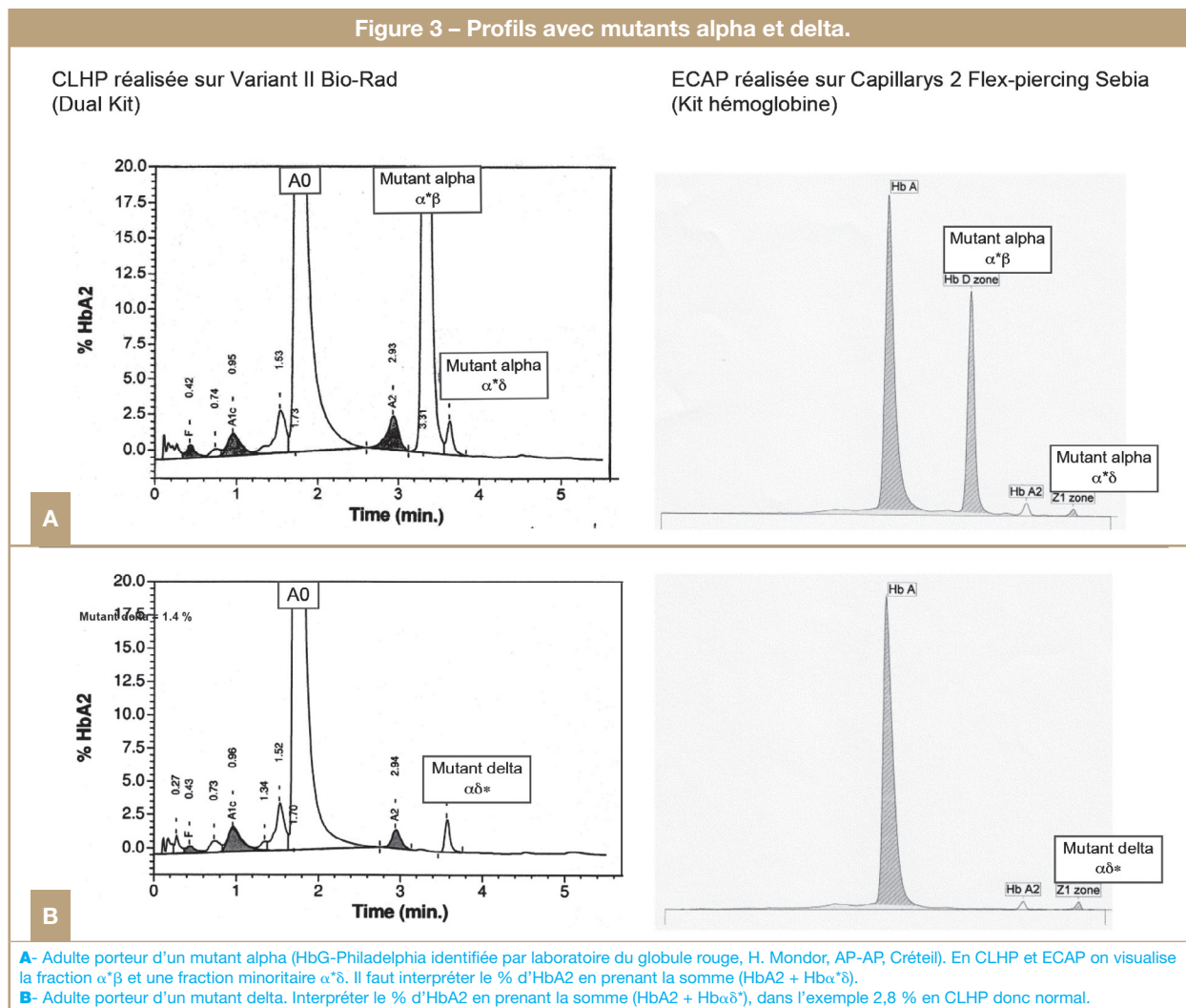
## 4.2.2. Alpha-thalassémies

Les  $\alpha$ -thalassémies sont largement répandues dans le monde et fréquentes dans le sud-est asiatique et sur le pourtour du bassin méditerranéen. Elles sont d'autant plus sévères que le nombre de gènes  $\alpha$  touchés est élevé et se manifestent dès la vie fœtale par un excès de chaîne  $\gamma$  qui forment des tétramères  $\gamma_4$  ou Hb-Bart's puis à l'âge adulte par un excès de chaîne  $\gamma$  qui forment des tétramères  $\gamma_4$  ou HbH.

L'inactivation d'un seul gène ( $\alpha\alpha/\alpha^-$ ) est responsable d'une  $\alpha$ -thalassémie silencieuse asymptomatique: les sujets adultes présentent une discrète et inconstante microcytose hypochrome; les nouveau-nés ont 1 à 3 % d'Hb-Bart's. L'inactivation de deux gènes correspond soit à une



Figure 3 – Profils avec mutants alpha et delta.



$\alpha^+$ -thalassémie homozygote ( $-\alpha/-\alpha$ ) ou  $\alpha^0$ -thalassémie hétérozygote ( $-/-\alpha\alpha$ ) et est responsable d'un trait  $\alpha$ -thalassémique asymptomatique : les sujets adultes présentent une microcytose (VGM < 75 fl) hypochrome (TCMH < 25 pg), une discrète anémie (Hb > 11 g/dL) et de façon très inconsistante une HbA2 diminuée ; les nouveau-nés ont 5 à 10 % d'Hb-Bart's. Il est impossible de différencier sur le plan phénotypique ces deux conditions et une analyse moléculaire est nécessaire pour un conseil génétique approprié. L'inactivation de trois gènes ( $-/-\alpha$ ) est responsable de l'hémoglobine H, syndrome de thalassémie intermédiaire : les sujets adultes présentent une anémie (Hb 8 à 11 g/dL) microcytaire (VGM < 70 fl) hypochrome (TCMH < 21 pg) régénérative, une HbA2 diminuée (< 1,5 %) et 3 à 30 % d'HbH (**figure 2B**) ; les nouveau-nés présentent également une anémie microcytaire hypochrome régénérative et ont 20 à 40 % d'Hb-Bart's. L'inactivation des quatre gènes ( $-/-$ ) est responsable d'une anémie fœtale intense avec mort par *hydrops foetalis* [18].

La CLHP et l'ECAP permettent de mettre en évidence l'Hb-Bart's et l'HbH. La lecture des chromatogrammes doit être faite par un utilisateur expérimenté afin de ne pas confondre l'Hb-Bart's ou l'HbH avec un artefact d'injection ni l'HbH dégradée avec de l'HbF [19].

#### 4.3. Hémoglobines anormales fréquentes

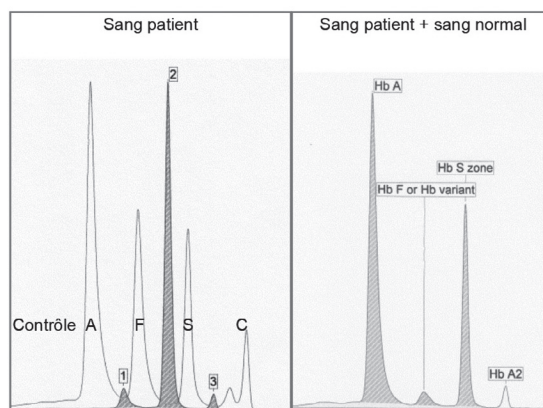
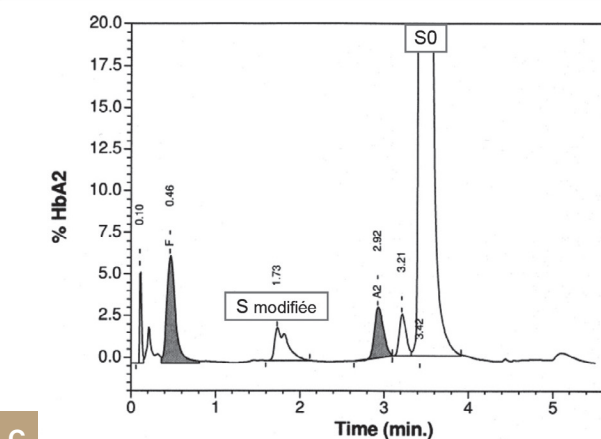
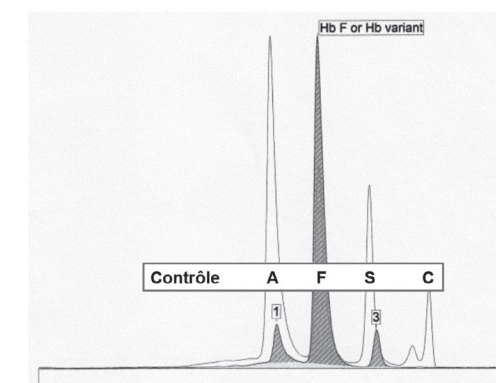
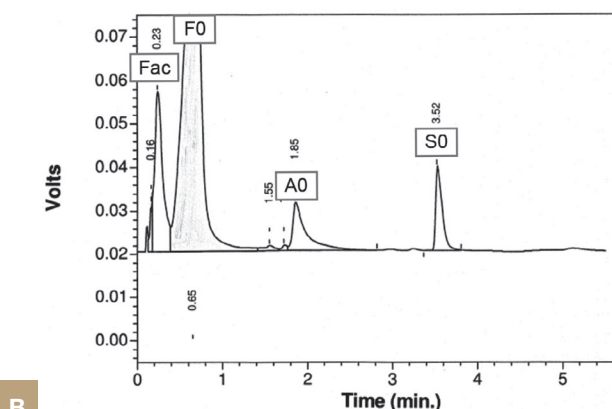
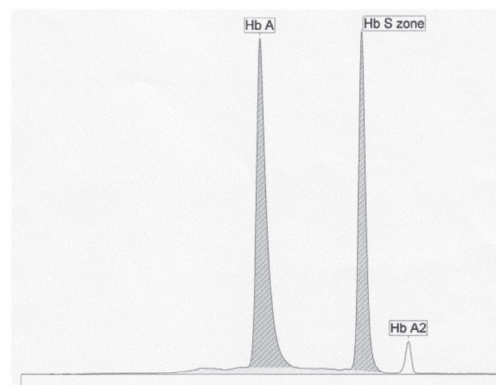
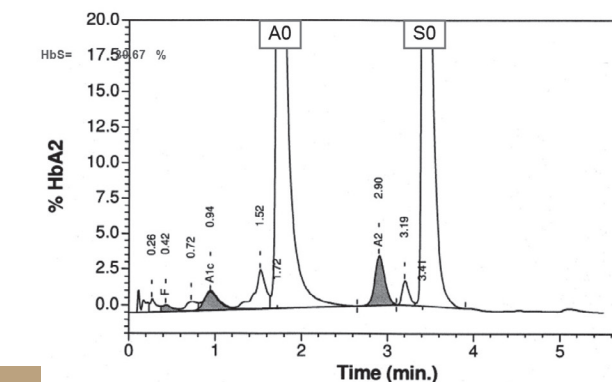
Trois variants de la chaîne  $\beta$  à l'origine de syndromes drépanocytaires ont diffusé avec une grande fréquence épidémiologique dans les régions impaludées en raison de la survie préférentielle des hétérozygotes et de la fréquence des mariages endogamiques dans certaines régions. Ce sont les Hb S, C et E qui représentent à l'échelle mondiale des problèmes de santé publique. Trois autres variants plus rares sont également impliqués dans les SDM, ce sont les HbD-Punjab, O-Arab et Lepore. Un variant asymptomatique, fréquent en Afrique, l'Hb-Hope, doit être reconnu en raison de son interférence sur les dosages d'Hb A1c par méthode chromatographique. Les autres variants  $\beta$  sont rares et ne sont généralement pas pathologiques ; en l'absence d'anomalie clinique leur identification formelle n'est pas nécessaire.

Les variants de la chaîne  $\alpha$  sont plus rares et sont rarement pathologiques ; en l'absence d'anomalie clinique leur identification formelle n'est pas nécessaire. En CLHP et ECAP, ils se caractérisent par la présence de deux fractions anormales, une fraction  $\alpha^*\beta$  s'exprimant à l'état hétérozygote entre 15 et 35 % selon que la mutation affecte le gène  $\alpha 1$  ou  $\alpha 2$  et une fraction mineure  $\alpha^*\delta$  souvent plus facilement détectée en ECAP (**figure 3A**).

Figure 4 – Profils avec HbS.

CLHP réalisée sur Variant II Bio-Rad  
(Dual Kit)

ECAP réalisée sur Capillarys 2 Flex-piercing Sebia  
(Kit hémoglobine)



**A-** Adulte A/S: l'HbS est éluée en zone S en CLHP et en ECAP.

**B-** Nouveau-né A/S: l'HbS est identifiée en zone s en CLHP, l'HbA (1) et l'HbS (3) ne sont pas identifiées en ECAP car le logiciel qui a besoin de la présence de l'HbA et de l'HbA2 pour identifier ces deux hémoglobines.

**C-** Adulte S/S: l'HbS dégradée est éluée en CLHP en position A0; le profil n'est pas recentré en ECAP en l'absence d'HbA et les fractions ne sont pas identifiées (1 = HbF, 2 = HbS et 3 = HbA2); l'HbS est identifiée en passant un mélange de sang du patient avec du sang normal.

Les variants de la chaîne  $\delta$  sont fréquents mais non pathologiques. Il est important de les détecter pour pouvoir interpréter la valeur de l'HbA2 en prenant la somme de l'HbA2 et de l'HbA2 mutée pour le diagnostic de  $\beta$ -thalassémie (figure 3B).

#### 4.3.1. HbS

L'HbS ( $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$ ) est fréquente en Afrique sub-saharienne et également retrouvée aux Antilles, au Maghreb, en Sicile, en Grèce, dans tout le Moyen-Orient et aux Indes. Sa répartition actuelle est mondiale en raison des

flux migratoires. L'HbS présente une charge différente de l'HbA en raison du remplacement d'un acide glutamique de surface par un acide aminé neutre, la valine [20]. Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'une fraction en fenêtre S en CLHP et en ECAP, électrophorèse alcaline ou isoélectrofocalisation. La confirmation peut se faire par une électrophorèse acide qui montrera une bande en position S ou un test d'Itano qui sera positif dès que l'Hb S est > 20 %. Le taux d'expression de l'HbS et les données clinico-biologiques permettront de conclure [21]. Le taux de l'HbS chez le sujet hétérozygote (**figure 4A**) est de 35 à 45 % chez l'adulte et chez le nouveau-né il est inférieur au taux d'HbA (**figure 4B**). Les paramètres érythrocytaires sont normaux, sans anémie, ni microcytose ou hypochromie. Chez un hétérozygote symptomatique, un double mutant présentant une seconde mutation sur le gène de l'HbS qui favorise la polymérisation peut être suspectée. Le double mutant le plus connu est l'HbS-Antilles ( $\beta 23 \text{ Val} \rightarrow \text{Ile}$ ) dont la migration en isoélectrocatérisation est un peu plus lente que celle de l'HbS.

Un taux faible d'HbS est retrouvé en cas de carence martiale ou d' $\alpha$ -thalassémie associées qui se traduisent par une microcytose et une hypochromie (et généralement une anémie en cas de carence martiale). Plus le nombre de gènes alpha atteints est grand, plus le taux d'Hb S est faible: HbS entre 30 et 35 % si  $\alpha$ -thalassémie hétérozygote ( $-\alpha/\alpha$ ); HbS entre 25 et 30 % si  $\alpha$ -thalassémie homozygote ( $-\alpha/-\alpha$ ) ou  $\alpha 0$ -thalassémie hétérozygote ( $-/-\alpha$ ). En cas de rare association avec une hémoglobinose H ( $-\alpha/\alpha$ ), le taux d'HbS est < 20 % et l'expression clinico-biologique est celle de l'hémoglobinose H (thalassémie intermédiaire). Un taux d'HbS élevé, supérieur à celui de l'HbA, est indicatif d'une hétérozygotie composite S/ $\beta$ + thalassémie responsable d'un SDM atténué [21].

En l'absence d'HbA (**figure 4C**), le diagnostic sera celui de SDM: drépanocytose homozygote SS ou hétérozygotie composite S/ $\beta 0$ . Le diagnostic différentiel peut se faire par l'étude du phénotype des parents ou par analyse moléculaire. En CLHP, il existe une petite fraction d'HbS modifiée qui migre en HbA0 alors qu'en ECAP l'absence d'HbA est plus facile à objectiver. Cependant en ECAP, les profils étant habituellement recentrés avec les pics d'HbA et d'HbA2, les profils sont décalés en l'absence d'HbA et il faut analyser un mélange du sang du patient avec un sang normal pour confirmer la fenêtre de migration de l'HbS.

La physiopathologie des SMD résulte de la polymérisation de l'HbS désoxygénée jusqu'à former des réseaux de fibres à l'intérieur des globules rouges qui prennent alors la forme de drépanocytes ou hématies falciformes visibles sur les frottis sanguins. L'HbF est toujours augmentée et son taux dépend des facteurs génétiques présents sur le cluster  $\beta$  définissant les haplotypes et des facteurs dispersés définissant les facteurs *en trans*. L'HbF est de 5 à 7 % pour les haplotypes Bantu, Bénin et Cameroun, de 7 à 10 % pour l'haplotype Sénégal et de 10 à 15 % pour l'haplotype Arabe-Indien. Des forts taux d'HbF (> 25 %) sont plus rares et font suspecter une hétérozygotie composite S/PHHF délétionnelle, asymptomatique. Les taux d'HbF seront mesurés régulièrement chez les patients traités par l'hydroxycarbamide (hydroxyurée) pour évaluer

l'efficacité de ce traitement qui vise à augmenter l'HbF afin de prévenir la polymérisation de l'HbS [21].

Le taux d'HbA2 est augmenté en CLHP en raison de la co-élution de certains dérivés de l'HbS avec l'HbA2. Le taux d'HbA2 en présence d'HbS n'est pas affecté en ECAP. Cependant, la quantification exacte de l'HbA2 est sans intérêt en présence d'HbS puisque le taux d'HbA2 ne doit pas être interprété dès qu'il existe un variant  $\beta$ .

#### 4.3.2. HbC

L'HbC ( $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$ ) est le deuxième variant de l'Hb le plus fréquemment rencontré, initialement originaire d'Afrique de l'Ouest. L'HbC présente une charge différente de l'HbA en raison du remplacement d'un acide glutamique de surface par un acide aminé basique, la lysine. Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'une fraction en fenêtre C en CLHP et en ECAP, électrophorèse alcaline ou isoélectrofocalisation. Le taux d'HbA2 est augmenté en ECAP en raison d'une séparation incomplète entre l'HbC et l'HbA2. Le taux d'HbA2 n'est pas affecté par l'HbC en CLHP. Cependant, la quantification exacte de l'HbA2 est sans intérêt puisque le taux d'HbA2 ne doit pas être interprété dès qu'il existe un variant  $\beta$ . La confirmation d'une HbC peut se faire par une électrophorèse acide qui montrera une bande en position C.

Comme pour l'HbS, le taux d'expression de l'HbC à l'état hétérozygote est de l'ordre de 35 à 45 % (**figure 5A**). Il existe une discrète microcytose hypochrome. Des taux plus faibles d'HbC, comme pour l'HbS, seront retrouvés en cas d'association avec une carence martiale ou une  $\alpha$ -thalassémie tandis que l'HbC sera supérieure à l'HbA en cas d'hétérozygotie composite C/ $\beta$ + thalassémie. En l'absence d'HbA, il peut s'agir d'une homozygotie C/C ou d'une hétérozygotie composite C/ $\beta 0$  thalassémie. Les sujets C/ $\beta$ + et C/C présentent une discrète anémie microcytaire régénérative avec de nombreuses cellules cibles, en général bien compensée, tandis que les patients C/ $\beta 0$  sont plus symptomatiques et peuvent présenter un tableau de thalassémie intermédiaire [22].

L'hétérozygotie composite S/C fréquente est responsable d'un SDM. Elle est mise en évidence par l'absence d'HbA et la présence de deux fractions, l'une en zone S et l'autre en zone C après l'HbA2 (**figure 5B**).

#### 4.3.3. HbE

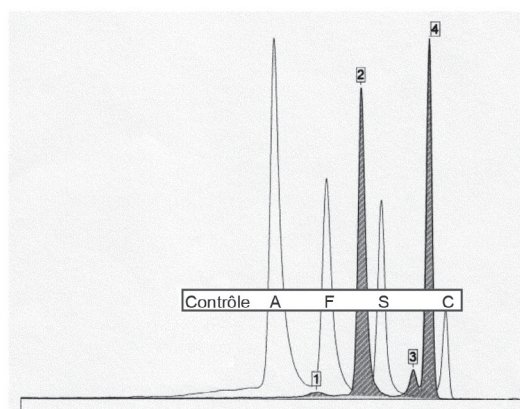
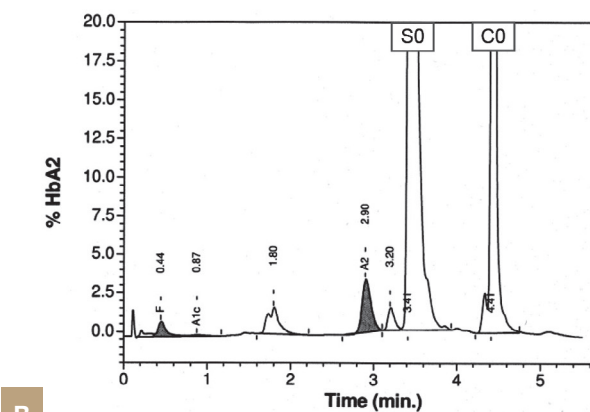
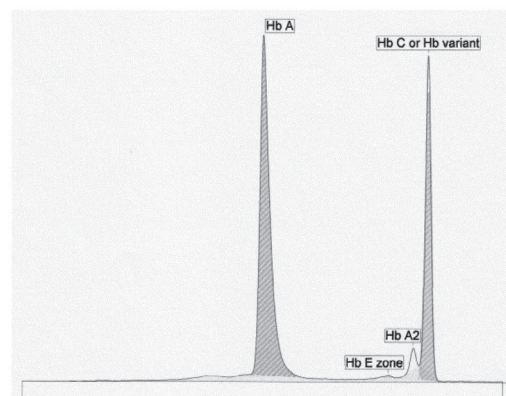
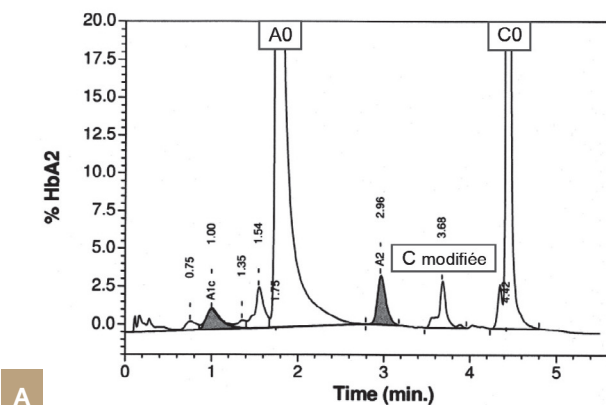
L'HbE ( $\beta 26 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$ ) est fréquente en Asie du sud-est (Cambodge, Laos, Thaïlande), dans le sud de la Chine et au nord de l'Inde. La mutation n'affecte pas les propriétés fonctionnelles de l'Hb mais elle démasque un site d'épissage alternatif qui conduit à une synthèse avortée pour une partie de la chaîne mutée et conduit ainsi à un défaut  $\beta$ -thalassémique. L'HbE présente une charge différente de l'HbA en raison du remplacement d'un acide glutamique de surface par un acide aminé basique, la lysine. Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'une fraction en HbA2 en CLHP, en zone E devant l'HbA2 en ECAP ou isoélectrofocalisation et en zone C en électrophorèse alcaline (**figure 6**). En CLHP, l'HbE co-élue avec l'HbA2 qui n'est donc pas mesurable et la valeur indiquée pour l'HbE correspond en fait à la somme Hb E + Hb A2. En ECAP, l'HbE est séparée de l'HbA2 et le taux d'HbE mesuré est



Figure 5 – Profils avec HbC.

CLHP réalisée sur Variant II Bio-Rad  
(Dual Kit)

ECAP réalisée sur Capillarys 2 Flex-piercing Sebia  
(Kit hémoglobine)



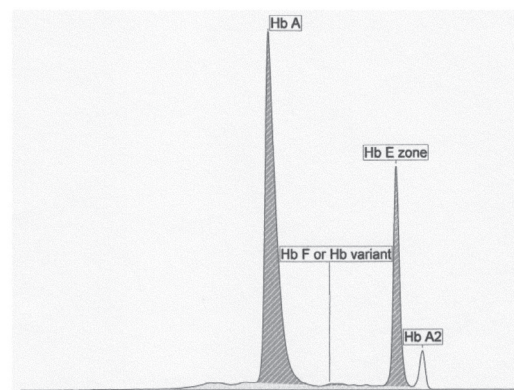
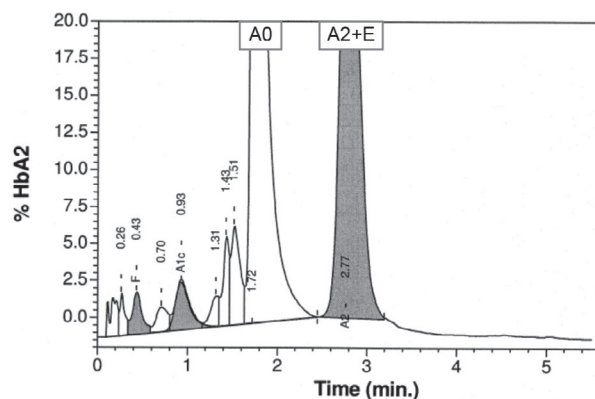
**A**- Adulte A/C: l'HbC est éluée en zone C en CLHP et en ECAP.

**B**- Adulte S/C: l'HbS dégradée est éluée en CLHP en position A0; le profil n'est recentré en ECAP en l'absence d'HbA et les fractions ne sont pas identifiées (1 = Hb F, 2 = HbS, 3 = HbA2 et 4 = C); il est souhaitable de repasser l'échantillon mélangé à volume égal avec un échantillon normal pour confirmer l'identification.

Figure 6 – Profils avec HbE.

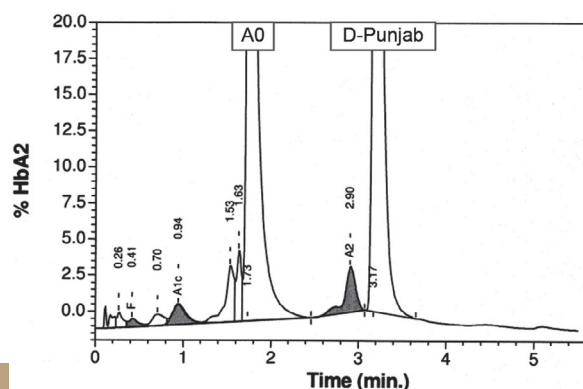
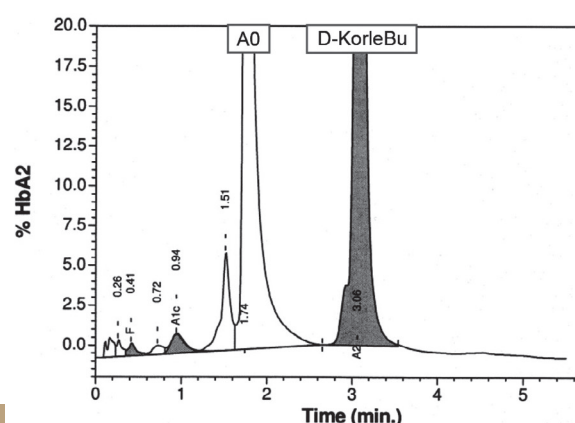
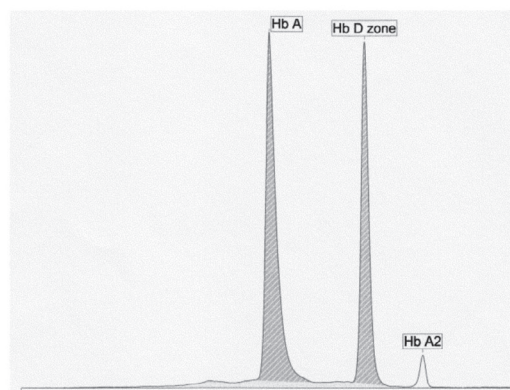
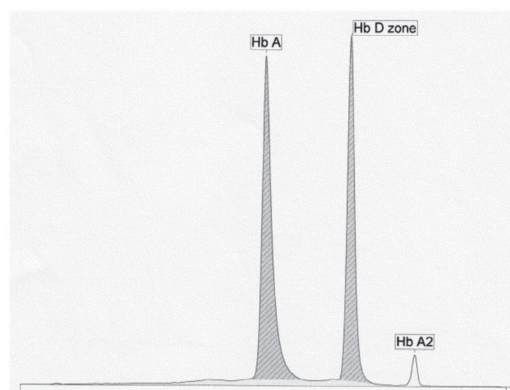
CLHP réalisée sur Variant II Bio-Rad  
(Dual Kit)

ECAP réalisée sur Capillarys 2 Flex-piercing Sebia  
(Kit hémoglobine)



Adulte A/E: l'HbE est éluée avec l'Hb A2 en CLHP et le logiciel identifie et quantifie comme HbA2 la somme (HbA2 + HbE); l'HbE migre en zone E en ECAP.



**Figure 7- Profils avec Hb D** (Hb identifiées par laboratoire du globule rouge, H. Mondor, APHP).CLHP réalisée sur Variant II Bio-Rad  
(Dual Kit)ECAP réalisée sur Capillarys 2 Flex-piercing Sebia  
(Kit hémoglobine)**A****B****A-** Adulte A/D-Punjab: l'HbD-Punjab est éluée après l'HbA2 en CLHP et en zone D en ECAP.**B-** Adulte A/D-Korle Bu: l'HbD-Korle Bu migre avec l'HbA2 en CLHP et le logiciel identifie et quantifie comme HbA2 la somme (HbA2 + HbD-Korle Bu); l'HbD-Korle Bu migre en zone D en ECAP.

plus faible puisqu'il n'inclut pas l'HbA2. La confirmation d'une HbE peut se faire par une électrophorèse acide où l'HbE comigre avec l'HbA.

Le taux d'expression de l'HbE à l'état hétérozygote est de l'ordre de 30 % (figure 6) du fait de son caractère  $\beta$ -thalassémique se traduisant par une discrète microcytose hypochrome. Des taux plus faibles d'HbE sont retrouvés en cas d'association avec une carence martiale ou une  $\alpha$ -thalassémie tandis qu'une l'HbE > 40 % est évocatrice d'une hétérozygotie composite E/  $\beta^+$  thalassémie. En l'absence d'HbA, il peut s'agir d'une homozygotie E/E ou d'une hétérozygotie composite E/ $\beta^0$  thalassémie. Les sujets homozygotes E/E présentent une microcytose marquée avec de nombreuses cellules cibles mais sont en général non anémiques et asymptomatiques. Les sujets E/ $\beta^0$  présentent une anémie variable et un tableau de thalassémie intermédiaire à majeure. L'étude de l'Hb chez les parents permet de confirmer si le sujet est E/E ou E/ $\beta$ -thalassémie. La caractérisation moléculaire du défaut  $\beta$ -thalassémique par un laboratoire de référence est recommandée [23]. L'hétérozygotie composite S/E responsable d'un SDM atténué est assez fréquente et est facile à mettre en

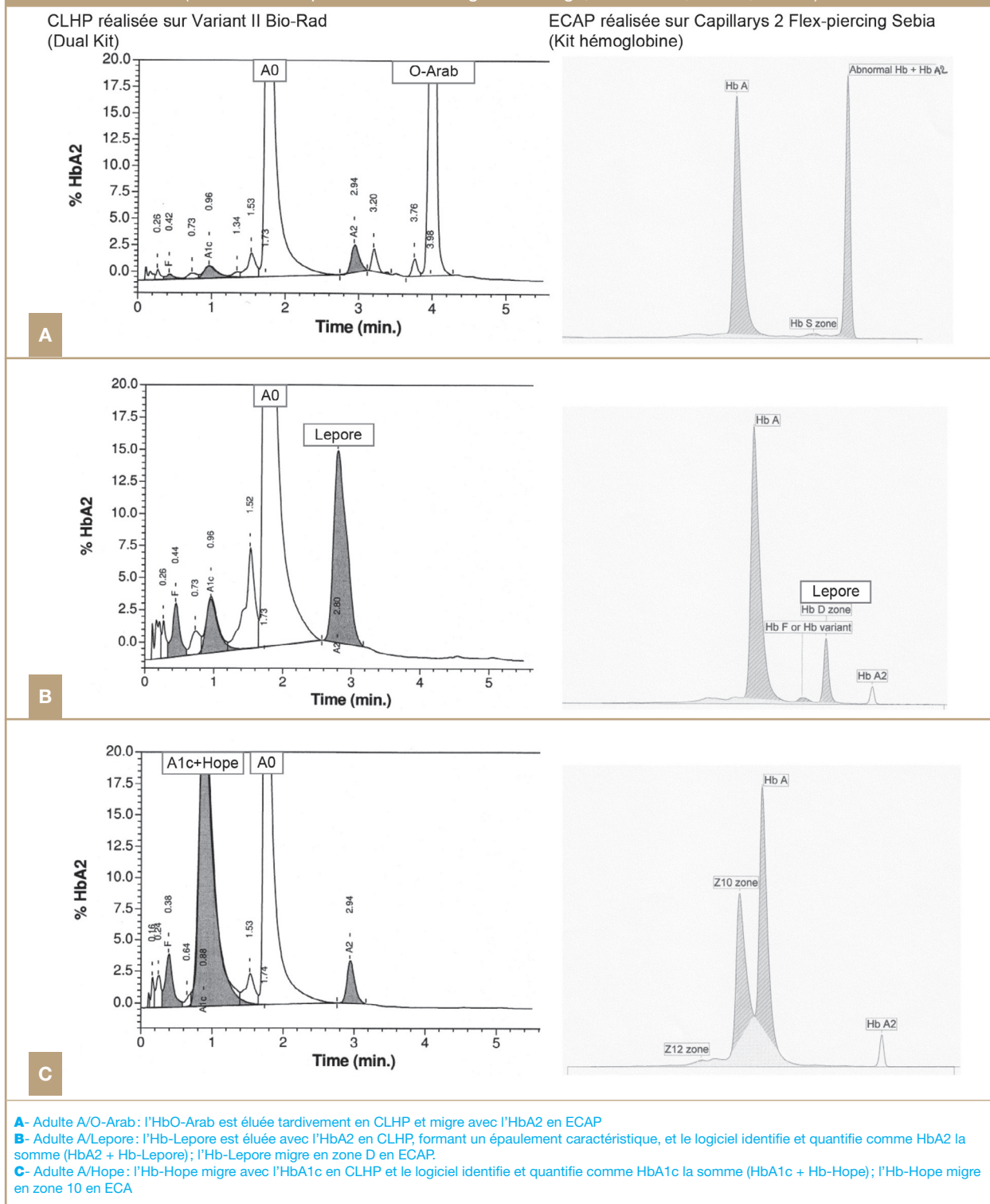
évidence en l'absence d'HbA et présence de deux fractions l'une en zone S et l'autre en zone E.

#### 4.3.4. HbD-Punjab

L'HbD-Punjab ( $\beta 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Gln}$ ) est retrouvée avec une forte prévalence chez les Sikhs du Punjab et dans les populations du nord-ouest de l'Inde. L'HbD-Punjab présente une charge différente de l'HbA en raison du remplacement d'un acide glutamique de surface par un acide aminé neutre, la glutamine. Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'une fraction migrant juste après l'HbA2 en CLHP, en zone D en ECAP ou isoélectrofocalisation et en zone S en électrophorèse alcaline. Le taux d'expression de l'HbD-Punjab à l'état hétérozygote est de l'ordre de 40 % (figure 7A). Il existe de nombreuses hémoglobines D et seule l'HbD-Punjab est responsable en association avec l'HbS d'un SDM [24]. L'électrophorèse acide est peu informative puisque l'HbD-Punjab comigre avec l'HbA, comme toutes les HbD. Elle peut être reconnue par les laboratoires disposant d'une certaine expertise grâce à sa migration particulière en CLHP, différente des autres Hb D (figure 7B) mais il est souvent nécessaire d'avoir recours à un laboratoire de référence pour sa confirmation.

**Figure 8 – Profils avec autres mutant  $\beta$ .**

(Hb identifiées par laboratoire du globule rouge, H. Mondor, AP-AP, Créteil)



#### 4.3.5. HbO-Arab

L'HbO-Arab ( $\beta 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$ ), peu fréquente, est retrouvée en Europe orientale, en Afrique et dans le Moyen-Orient. L'HbO-Arab présente une charge différente de l'HbA en raison du remplacement d'un acide glutamique de surface par un acide aminé basique, la lysine. Le diagnostic repose sur la mise en

évidence d'une fraction migrant juste avant l'HbC en CLHP, en zone C en ECAP, isoélectrofocalisation ou électrophorèse alcaline (**figure 8A**). En électrophorèse acide l'HbO-Arab comigre avec l'HbS. L'HbO-Arab est responsable en association avec l'HbS d'un SDM et il est important de la détecter. Son identification sera confiée à un laboratoire de référence [24].

#### 4.3.6. Hb-Lepore

L'Hb-Lepore est un hybride  $\delta\beta$  qui résulte d'un *crossing-over* non homologue entre les gènes  $\delta$  et  $\beta$ , l'extrémité 5' du gène recombinant étant de type  $\delta$  et l'extrémité 3' de type  $\beta$ . Le promoteur de ce gène étant de type  $\delta$ , le gène recombinant est peu exprimé, de l'ordre de 10 à 15 %, et s'apparente à un défaut  $\beta$ -thalassémique.

Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'une fraction formant un épaulement caractéristique avec l'HbA2 en CLHP et migrant près de l'HbS en ECAP ou isoélectrofocalisation et avec l'HbS en électrophorèse alcaline (figure 8B). En électrophorèse acide l'Hb-Lepore migre avec l'Hb A. Le taux d'expression de l'Hb-Lepore à l'état hétérozygote est de 8 à 15 % du fait de son caractère  $\beta$ -thalassémique et les sujets hétérozygotes ont un hémogramme évocateur de  $\beta$ -thalassémie hétérozygote. L'Hb-Lepore à l'état homozygote ou hétérozygote composite avec un autre défaut  $\beta$ -thalassémique est responsable d'une thalassémie intermédiaire. L'Hb-Lepore en association avec l'HbS est responsable d'un SDM atténué [25]. Le recours à un laboratoire de référence pour un diagnostic de certitude est conseillé.

#### 4.3.7. Hb-Hope

L'Hb-Hope ( $\beta$ 136 Gly→Asp) initialement décrite dans une famille afro-américaine est retrouvée assez fréquemment

dans divers groupes ethniques. Ce variant est légèrement instable et a une affinité pour l'oxygène diminuée mais est généralement asymptomatique [26]. Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'une fraction de 40 à 50 % au niveau de HbA1c en CLHP, en zone 10 devant l'HbA en ECAP ou isoélectrofocalisation (figure 8C). La confirmation peut se faire par une électrophorèse acide où l'Hb-Hope migre près de l'HbF.

## 5. Conclusion

Le laboratoire effectuant le diagnostic des hémoglobinopathies doit choisir des techniques performantes et complémentaires. Il doit disposer de l'origine du patient et des paramètres érythrocytaires de la numération. L'objectif est de détecter et reconnaître les thalassémies et les principaux mutants d'intérêt clinique. La difficulté réside dans l'interprétation qualitative de plusieurs techniques pour identifier les Hb anormales les plus fréquentes et la connaissance des variations quantitatives pour poser le diagnostic des thalassémies et des hémoglobinopathies combinées.

**Conflits d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article

## Références

- [1] Management of haemoglobin disorders. World Health Organization, 2008. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43969/1/9789241597128\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43969/1/9789241597128_eng.pdf)
- [2] HbVar : A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemsias. <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>
- [3] NHS Sickle and Thalassaemia, Handbook for laboratories. 2012. [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/398702/LabHandbook2012Edition3v2.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/398702/LabHandbook2012Edition3v2.pdf)
- [4] Kaufmann O, Smit JW, Huisman W et al. Basic haemoglobinopathy diagnostics in Dutch laboratories; providing an informative test result. *Int Jnl Lab Hem* 2013; 35(4):428-35.
- [5] Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE). Bilan d'activité 2014. Paris: AFDPE; 2015. [http://www.afdphe.org/sites/default/files/bilan\\_afdphe\\_2014.pdf](http://www.afdphe.org/sites/default/files/bilan_afdphe_2014.pdf)
- [6] Giordano C. Strategies for basic laboratory diagnostics of the hemoglobinopathies in multi-ethnic societies: interpretation of results and pitfalls. *Int Jnl Lab Hem* 2013;35(5): 465-479.
- [7] Riou J, Godart C, Hurtel D et al. Cation exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. *Clin Chem* 1997;43(1):34-39;
- [8] Borbely N, Phelan L, Szydlo et al. Capillary zone electrophoresis for haemoglobinopathy diagnosis. *J Clin Pathol* 2013;66(1):29-39.
- [9] Réseau DHOS «pathologie héréditaire de l'érythrocyte». Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. *Ann Biol Clin* 2010;68(4):455-64.
- [10] Mosca A, Paleari R, Ivaldi G et al. The role of hemoglobin A2 testing in the diagnosis of thalassemsias and related hemoglobinopathies. *J Clin Pathol* 2009;62(1):13-17.
- [11] Mosca A, Paleari R, Wild B. Analytical goals for the determination of HbA2. *Clin Chem Lab Med* 2013;51(5):937-41.
- [12] Paleari R, Gulbis B, Cotton et al. Interlaboratory comparison of current high-performance methods for Hb A2. *Int Jnl Lab Hem* 2012; 34(4):462-68.
- [13] Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, et al. ICSH recommendations for the measurement of Haemoglobin A2. *Int Jnl of Lab Hem* 2012;34(1):1-13.
- [14] Mosca A, Paleari R, Leone D et al. The relevance of hemoglobin F measurement in the diagnosis of thalassemsias and related hemoglobinopathies. *Clin Biochem* 2009; 42(118), 1797-801.
- [15] Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, et al. ICSH recommendations for the measurement of Haemoglobin F. *Jnl of Lab Hem* 2012;34(1):14-20.
- [16] Joly P, Ponderre C, Badens C. Les bêta-thalassémies : aspects moléculaires, épidémiologiques, diagnostiques et cliniques. *Ann Biol Clin* 2014;72 (6):639-68.
- [17] Couque N, De Montalembert M. Diagnostic d'une hémoglobinopathie. *Feuilles de Biologie* 2013;311:5-18.
- [18] Ganello R, Cao A. Alpha-thalassaemia. *Genetics in Medicine* 2011;13(2):83-87.
- [19] Turley E, McFarlane A, Halchuk L, et al. Hemoglobin H identification by high-performance liquid chromatography in confirmed hemoglobin H disease. *Int Jnl Lab Hematol* 2015; 37(5), 668-72.
- [20] Rees DS, Williams T, Gladwin M. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010;376(9757):2018-31.
- [21] Bain B. Sickle cell haemoglobin and its interactions with other variant haemoglobins and with thalassemsias. In: *Haemoglobinopathy diagnosis*. Blackwell publishing; 2006.p139-88.
- [22] Cook CM, Smeltzer MP, Mortier NA, et al. The clinical and laboratory spectrum of Hb C [ $\beta$ 6(A3)Glu→Lys, GAG→AAG] disease. *Hemoglobin* 2013;37(1):16-25.
- [23] Fucharoen S, Weatherall DJ. The hemoglobin E thalassemsias. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2(8):1-15.
- [24] Wajcman H, Moradkhani K. Abnormal haemoglobins : detection & characterization. *Indian J Med Res* 2011;134(4):538-46.
- [25] Chaibunruang A, Srivorakun H, Fucharoen S, et al. Interactions of hemoglobin Lepore (deltabeta hybrid hemoglobin) with various hemoglobinopathies : A molecular and hematological characteristics and differential diagnosis. *Blood Cell Mol Dis* 2010;44(3):140-45.
- [26] Ingle J, Adewoye A, Dewan R, et al. Hb Hope [ $\beta$ 136(H14)Gly→Asp (GGT→GAT)]: interactions with Hb S [ $\beta$ 6(A3)Glu→Val (GAG→GTG)], other variant hemoglobins and thalassaemia. *Hemoglobin* 2004;28(4):277-85.



# Génétique des maladies de l'hémoglobine

Nathalie Couque<sup>a</sup>, Elisabeth Trawinski<sup>a</sup>, Jacques Elion<sup>a,b</sup>

## RÉSUMÉ

Les hémoglobinopathies, maladies génétiquement déterminées, sont de deux types. Dans les anomalies de structure, une hémoglobine (Hb) « anormale » est présente en quantité normale, entraînant ou non des signes fonctionnels. L'HbS, responsable de la drépanocytose, y a une place prépondérante. Les anomalies de synthèse, avec production en quantité diminuée d'Hb normale, constituent le groupe hétérogène des thalassémies. Les anomalies moléculaires présentes dans ces deux types de pathologies sont souvent similaires (mutation ponctuelle, large délétion...). Cependant les mécanismes physiopathologiques mis en cause sont très différents. La diversité des mutations n'explique que très partiellement l'hétérogénéité de présentation clinique. Le diagnostic moléculaire des hémoglobinopathies occupe actuellement une place importante dans le cadre du diagnostic, du conseil génétique et du diagnostic prénatal mais il nécessite toujours au préalable une analyse phénotypique précise.

**Anomalie qualitative - Bases moléculaires - thalassémies.**

## 1. Introduction

Les hémoglobinopathies sont des maladies génétiquement déterminées qui constituent un problème de santé publique dans de vastes parties du monde [1]. L'hémoglobine (Hb) est une protéine contenue sous forme soluble au sein des érythrocytes (ou globules rouges), cellules anucléées, avec une forte concentration intracellulaire d'environ 34 g/dL. L'érythrocyte a une structure de disque biconcave, parfaitement déformable et adapté à sa fonction de transport et de libération de l'oxygène jusqu'au niveau des capillaires les plus fins. Trois notions de bases majeures permettent de comprendre les maladies génétiques de l'hémoglobine : i) la structure tétramérique de la molécule d'Hb, avec 2 chaînes polypeptidiques identiques deux à deux, lui permettant d'assurer de façon optimale sa fonction oxyphorique ; ii) l'expression des différentes hémoglobines au cours du développement ; iii) l'organisation des gènes de l'Hb [2].

**a** Laboratoire de Génétique Moléculaire

Hôpital Robert Debré, AP-HP  
Paris

**b** Inserm UMR 1134

Université Paris Diderot, Sorbonne  
Paris Cité

\*Correspondance :

nathalie.couque@aphp.fr

## SUMMARY

### Molecular bases of haemoglobin diseases

Among haemoglobin diseases, two types are particularly important to consider: the structural abnormalities and the synthesis deficiencies. In structural anomalies, hemoglobin (Hb) "abnormal" is present in normal amounts, whether or not resulting functional signs. HbS, responsible for sickle cell disease, has a prominent place. Quantitative defect in the production amount of one of the globin sub-units, either total absence or marked reduction, constitute the heterogeneous group of thalassemia. Molecular abnormalities present in both types of disease are often similar (point mutation, deletion...). However, the pathophysiological mechanisms involved are very different. Multiple mutations are involved, but the severity of the disease is only partially related to the nature of the mutation. Molecular diagnosis of haemoglobinopathies currently plays an important role in the diagnosis, genetic counseling and prenatal diagnosis but it still requires prior specific phenotypic analysis.

**Structural abnormalities - molecular mechanism-thalassemias**

Les hémoglobinopathies sont classiquement séparées en deux catégories : soit un défaut qualitatif avec production en quantité normale d'une Hb « anormale » ; soit un défaut quantitatif de production de l'Hb normale, ce qui correspond à une thalassémie. La différence est physiopathologique plus que génétique car les mêmes anomalies moléculaires sont le plus souvent rencontrées dans les deux pathologies. La transmission est dans la très grande majorité des cas de type autosomique récessive. Le diagnostic moléculaire des hémoglobinopathies occupe actuellement une place importante dans le cadre du diagnostic, du conseil génétique et du diagnostic prénatal mais il nécessite toujours au préalable une analyse phénotypique précise.

## 2. Organisation génétique et régulation de l'expression des différentes hémoglobines

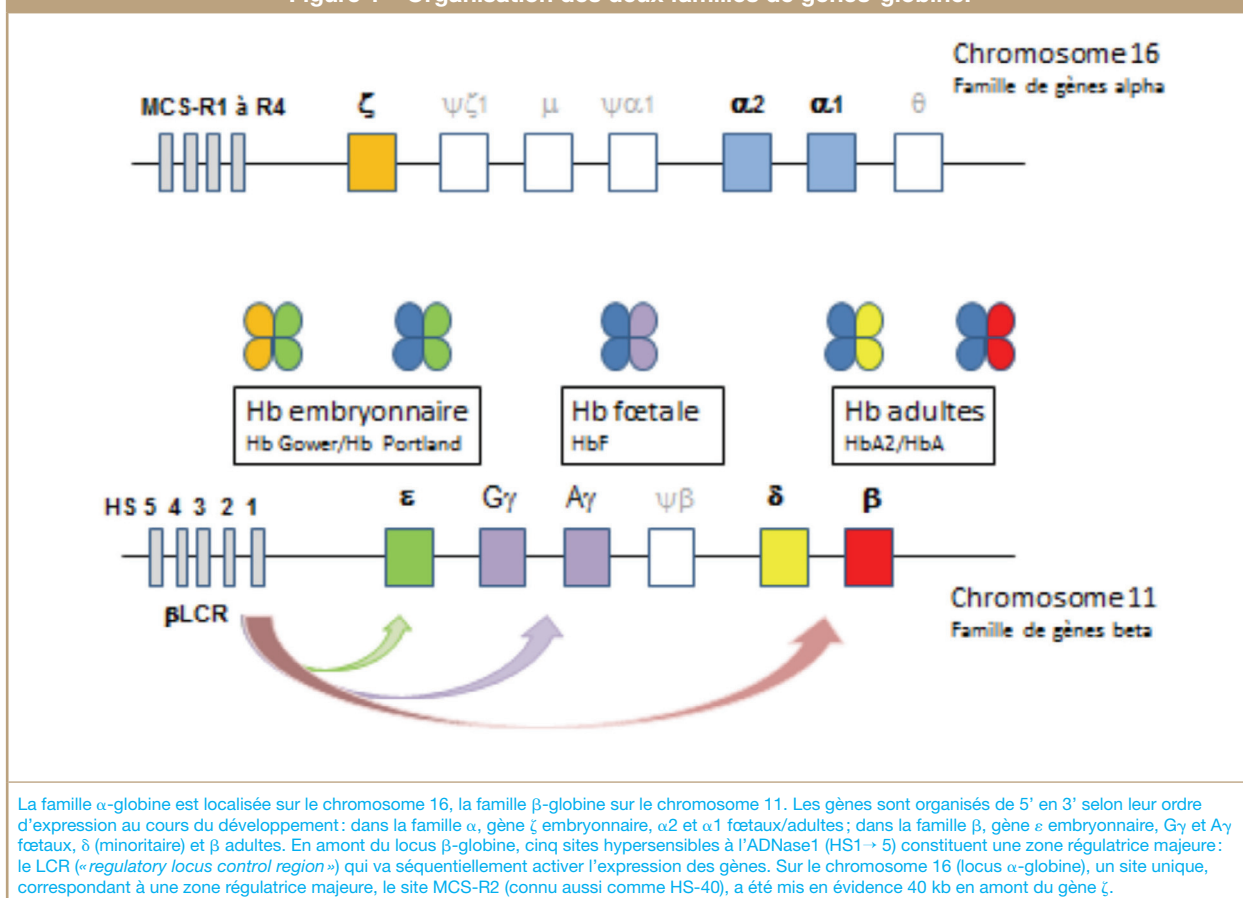
La régulation de l'expression de l'Hb est complexe car elle doit assurer la spécificité érythroïde de l'expression, l'expression séquentielle des différentes hémoglobines au cours du développement, un équilibre de production des différentes chaînes ( $\alpha/\gamma$  puis  $\alpha/\beta$ ) et une coordination avec la biosynthèse de l'hème.

Schématiquement, deux familles de gènes (ou cluster) contrôlent l'expression des chaînes de globine : le cluster

article reçu le 20 janvier, accepté le 3 février 2016

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Figure 1 – Organisation des deux familles de gènes-globine.



alpha et le cluster bêta (figure 1). Dans ces 2 familles, l'ordre des gènes sur le chromosome de 5' en 3' est le même que celui de leur expression au cours du développement. Le cluster alpha, situé sur le chromosome 16, proche de la région télomérique (16p13.3), comporte trois gènes fonctionnels : un gène embryonnaire  $\zeta$  (HBZ) et deux gènes exprimés dès la vie fœtale  $\alpha 2$  (HBA2) et  $\alpha 1$  (HBA1). Entre 25–65 kb en amont des gènes  $\alpha 2$  et  $\alpha 1$ , se situent 4 régions non-codantes hautement conservées : « *multispecies conserved sequences* » (MCS-R1 à -R4), qui contrôlèrent l'expression des gènes du cluster alpha. À l'heure actuelle, seul MCS-R2 (connu aussi comme HS-40) a été démontré comme essentiel à l'expression des gènes  $\alpha$  [3]. Ce cluster ne subit qu'une seule transition ou « switch » d'expression de gènes,  $\zeta$  vers  $\alpha$ , qui a lieu dès la 6<sup>e</sup> semaine de vie embryonnaire. Le cluster bêta, situé sur le chromosome 11, comporte 5 gènes fonctionnels : un gène embryonnaire  $\epsilon$  (HBE1), deux gènes fœtaux  $\gamma \gamma$  et  $\gamma \alpha$  (HBG2 et HBG1) et deux gènes adultes  $\delta$  et  $\beta$  (HBD et HBB). De façon similaire à la famille des gènes  $\alpha$ , en amont des gènes se situe le « *regulatory locus control region* » (LCR) jouant un rôle primordial dans le contrôle de l'expression des gènes de la famille  $\beta$  au cours du développement [4]. Ainsi, l'expression érythroïde-spécifique et séquentielle des gènes résulte de l'interaction du LCR de façon spécifique avec les promoteurs individuels des gènes de globine par formation de boucles chromatiniennes complexes. Ce cluster est le siège de deux « switch » consécutifs :

le premier de  $\epsilon$  vers  $\gamma$  a lieu précocement durant la vie embryonnaire ; le second de  $\gamma$  vers  $\delta$  et  $\beta$ , beaucoup plus tardif commence à la fin de la vie fœtale. Ce dernier, responsable de la transition de l'HbF vers l'HbA, est encore actuellement imparfaitement élucidé. Il fait intervenir un ensemble complexe et intriqué de facteurs de transcription, dont un des derniers découverts récemment, BCL11a, semble avoir un rôle majeur comme répresseur de l'expression des gènes  $\gamma$  [5].

La chaîne polypeptidique  $\alpha$ -globine de 141 acides aminés, doit s'associer avec différents partenaires au cours de la vie embryonnaire, fœtale et adulte ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ ). Sa synthèse est sous le contrôle d'au total 4 gènes  $\alpha$  codant tous pour une protéine de structure identique. Il a été démontré que les gènes  $\alpha 2$  sont plus exprimés que les gènes  $\alpha 1$  dans un rapport  $\alpha 2/\alpha 1$  d'environ 1,2 [6]. La chaîne polypeptidique  $\beta$ -globine de 146 acides aminés est sous le contrôle d'au total 2 gènes  $\beta$  et chaque gène  $\beta$  contribue pour 50 % de la synthèse des chaînes  $\beta$ .

Durant la différenciation érythroïde, les chaînes  $\alpha$ -globine ainsi que  $\beta$ -globine (ou  $\gamma$ -globine) sont exprimées à haut niveau. Cependant, il est important que les chaînes de globine soient synthétisées de façon équilibrée. Le déséquilibre entre les différentes chaînes est à la base de la physiopathologie des thalassémies. Les chaînes libres  $\alpha$ -globine en excès sont toxiques pour le globule rouge. Les chaînes néo-synthétisées se lient spontanément à l'hème formant des monomères d'Hb. Une protéine

chaperonne, stabilisant spécifiquement les monomères  $\alpha$ -Hb (chaînes  $\alpha$ -globine liées à l'hème), l'«  $\alpha$ -hemoglobin stabilizing protein » (AHSP) est synthétisée dans les cellules érythroïdes [7]. Lorsqu'elle rencontre un monomère  $\beta$ -Hb libre, le monomère  $\alpha$ -Hb se dissocie de l'AHSP pour former un dimère  $\alpha\beta$  stable. C'est l'association des dimères qui va aboutir à la forme tétramérique fonctionnelle de l'Hb telle que l'HbA adulte (Hb $\alpha_2\beta_2$ ).

### 3. Classification des hémoglobinopathies et bases moléculaires

La production d'une forte concentration d'Hb parfaitement fonctionnelle peut être altérée suite à des mutations sur les différents gènes de l'Hb. On distingue deux grands types d'anomalies, qui se différencient plus par la physiopathologie que par la génétique :

1. Les anomalies qualitatives qui altèrent la structure d'une chaîne de globine et par là, la fonctionnalité de l'Hb : modification de sa solubilité, de sa stabilité, de son affinité pour l'oxygène, de la fixation de l'hème ou de l'état d'oxydation de son atome de fer.

2. Les anomalies quantitatives qui altèrent le niveau de synthèse d'une des chaînes de globine. Le défaut de synthèse peut être total ou partiel. Ce groupe d'anomalies constitue les thalassémies.

Dans les anomalies qualitatives ou quantitatives, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas différents de ceux observés dans d'autres maladies génétiques, soit des mutations géniques de petite taille (substitutions nucléotidiques et insertions/délétions de quelques nucléotides), soit, plus volontiers pour les thalassémies, des mutations géniques de grande taille (essentiellement des délétions de gènes mais aussi parfois des duplications de gènes) [9].

#### 3.1. Mutations géniques de petite taille

Les substitutions nucléotidiques (remplacement d'une base nucléotidique par une autre), ainsi que les insertions/délétions de quelques nucléotides sont des mutations dites ponctuelles. Les substitutions nucléotidiques sont les plus fréquentes. On distingue les transitions (remplacement d'une base pyrimidique (C/T) ou purique (A/G) par une autre base de même nature) et les transversions (remplacement d'une base purique par une base pyrimidique, ou inversement). Les transitions sont plus fréquentes que les transversions, et tout particulièrement au niveau des dinucléotides CG. En effet la méthylation de l'ADN intervient préférentiellement en position 5 des cytosines précédant les guanines (dinucléotides CpG). De façon fréquente, la cytosine méthylée subit une réaction de désamination oxydative à l'origine d'une transition C > T. Le mésappariement T : G qui en résulte au sein de l'ADN est difficilement détectable par les systèmes de réparation.

Dans les régions codantes, en fonction de leur position dans le codon, ces substitutions peuvent entraîner une modification de la nature de l'acide aminé codé : on parle alors de substitution faux-sens. En raison de la dégénérescence du code génétique, les mutations de la 1<sup>re</sup> ou 2<sup>nd</sup>e

base entraînent plus fréquemment une substitution d'acide aminé que les mutations de la 3<sup>e</sup> base. Ainsi il est décrit que les mutations de la 3<sup>e</sup> base conduisent dans environ 75 % des cas à une mutation dite silencieuse, c'est-à-dire sans conséquence clinique. Cependant ces mutations silencieuses peuvent être pathologiques lorsqu'elles activent des sites cryptiques d'épissage. Les substitutions nucléotidiques aboutissant à la formation d'un codon Stop sont appelées substitution non-sens. Elles entraînent généralement l'absence de formation de la protéine, ou la formation d'une protéine tronquée la plupart du temps non fonctionnelle.

Dans les régions introniques, tout particulièrement au niveau des jonctions introns/exons, les mutations affectant les sites consensus d'épissage altèrent la maturation de l'ARN et aboutissent à un défaut d'expression de la protéine normale.

Dans les régions régulatrices de l'expression du gène, spécialement au niveau du promoteur, ces substitutions peuvent affecter l'expression du gène en altérant un site consensus de liaison d'un facteur de transcription. Enfin, au niveau du site de polyadénylation, ces substitutions perturbent la maturation de l'extrémité 3' de l'ARN et sont responsables d'une diminution de la stabilité du transcrit. Des délétions ou insertions de quelques nucléotides non multiples de trois bases entraînent au niveau des séquences codantes un décalage du cadre de lecture (frame shift) qui aboutit à l'apparition d'un codon Stop prématuré avec absence de formation de la protéine ou synthèse d'une protéine tronquée. Dans les cas de délétions ou insertions de trois bases ou d'un multiple de trois bases, la protéine codée présentera une délétion ou une insertion d'un ou plusieurs acides aminés, avec des conséquences fonctionnelles variables en fonction de leur localisation au sein de la structure de la protéine.

#### 3.2. Mutations géniques de grande taille

Les réarrangements génomiques de grande taille impliquent en général des séquences très semblables comme les séquences répétées dispersées de type Alu ou des gènes en tandem, comme par exemple les gènes  $\alpha$ -globine, qui du fait de l'homologie très importante de séquence sont des structures hautement recombinogènes. Elles favorisent les recombinaisons homologues non allélique au moment de la méiose avec comme conséquences des délétions, des duplications...

En pratique clinique, nous nous intéressons essentiellement aux anomalies survenant sur les chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .

Les séquences nucléotidiques des gènes de globine et de leur environnement sont aujourd'hui parfaitement établies.

Les gènes de globine dérivent tous d'un ancêtre unique, ce qui explique leur structure globale identique : trois zones codantes (exons) séparées par deux zones non-codantes (introns). Il existe également des zones non codantes situées en 5' et 3' des gènes (« flanking regions »). Les introns débutent classiquement par une séquence GT et se terminent par une séquence AG afin de permettre leur excision et l'épissage des exons au moment de la maturation des ARN messagers (ARNm).

En 5' de la région transcrite se situe le promoteur du gène.



Cette zone, impliquée dans la fixation de l'ARN-polymérase, est constituée d'environ 100 à 200 nucléotides avant le site d'initiation de la transcription et inclut les zones fonctionnelles importantes CACC, CCAAT et TATA où vont se fixer des facteurs de transcription [8].

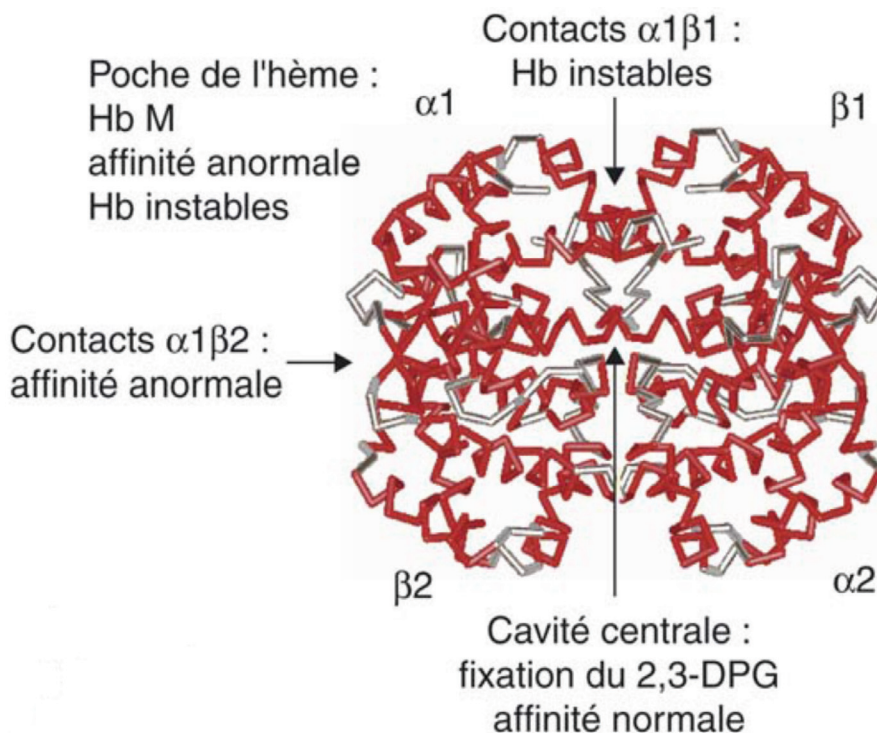
De nombreuses hémoglobinopathies, notamment qualitatives, sont sans conséquence pathologique et peuvent être découvertes de façon fortuite sans aucun point d'appel clinique ou hématologique. Pour le biologiste, il est important de connaître les anomalies associées à des manifestations cliniques. Celles-ci se limitent à 5 grands cadres : les mutants associés à un phénotype thalassémique, les syndromes drépanocytaires majeurs, les mutants instables responsables d'anémie hémolytique, les mutants à affinité augmentée pour l'oxygène responsable d'érythrocytose, les mutants à affinité diminuée pour l'oxygène et les hémoglobines M associées à une méthémoglobinémie [10]. Ces anomalies sont pour les plus fréquentes congénitales de type monogénique récessive. De rare cas peuvent être dominant ou acquis.

## 4. Bases moléculaires des anomalies qualitatives

Les Hb anormales sont les variants protéiques les plus décrits depuis la mise en évidence en 1949 de l'HbS (p.Glu7Val), responsable de la drépanocytose [11].

Chez les porteurs hétérozygotes, l'expression des hémoglobines anormales est d'environ 40 % pour les variants de la chaîne  $\beta$ , nettement inférieure, 20 à 25 % pour ceux de la chaîne  $\alpha$ . Nous ne parlerons pas ici des variants de la chaîne  $\gamma$  exprimés exclusivement pendant la période fœtale et néonatale. Les anomalies qualitatives sont généralement en rapport avec des mutations ponctuelles présentes au niveau des exons codants. Les conséquences physiopathologiques des différentes mutations peuvent être logiquement interprétées en fonction de leur localisation au sein de la structure tridimensionnelle de l'Hb (**figure 2**). Comme nous l'avons vu dans le premier article (« Les hémoglobines normales et pathologiques »), la structure de chaque chaîne de globine est remarquablement conservée et résulte du repliement de 6 à 8 hélices formant une poche hydrophobe autour de la molécule d'hème. Les résidus localisés en surface sont généralement hydrophiles. Au contraire, ceux orientés vers l'intérieur de la molécule sont généralement hydrophobes et, par interactions avec des résidus d'autres hélices, jouent un rôle stabilisateur important dans la structure de la molécule. Ainsi des rapports très intriqués existent entre chaînes  $\alpha 1\beta 1$  (ou  $\alpha 2\beta 2$ ). À l'inverse, il existe moins de contacts directs entre sous-unités  $\alpha 1\beta 2$  et  $\alpha 2\beta 1$ , mais ces contacts sont essentiels pour la transition allostérique lors de la fixation d'oxygène. Au niveau de la cavité centrale, un contact important est établi entre les chaînes  $\beta$  par l'intermédiaire d'une molécule, le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG) qui stabilise la configuration désoxygénée.

Figure 2 – Structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte (HbA).



Le tétramère  $\alpha 2\beta 2$  est une molécule globulaire. Les régions fonctionnellement importantes sont indiquées ainsi que les conséquences physiopathologiques des différents variants selon la localisation de la mutation dans la molécule (illustration d'après [2]).

#### 4.1. Variants fréquents à l'origine de problèmes de santé publique majeurs

Les variants les plus fréquemment diagnostiqués, sont ceux qui, suite à des modifications physicochimiques, peuvent être facilement séparés de l'HbA par électrophorèse ou chromatographie. Ces modifications physicochimiques sont essentiellement des modifications de charge de surface qui touchent des résidus polaires n'intervenant généralement pas dans une fonction majeure de l'Hb, exception faite pour le variant le plus fréquent : l'HbS (p.Glu7Val), responsable d'une modification de la solubilité de l'Hb à la base de la physiopathologie de la drépanocytose. Les variants communs, cliniquement importants, sont par ordre de fréquence: HbS, HbC (p.Glu7Lys), HbE (p.Glu27Lys), HbD-Punjab (p.Glu122Gln) et HbO-Arab (p.Glu122Lys). Les 3 plus fréquents (HbS, HbC, HbE) sont classiquement diagnostiqués par une étude phénotypique complète (association de plusieurs techniques d'analyse protéique). En revanche l'HbD-Punjab, l'HbO-Arab et tout autre variant non identifié peuvent bénéficier d'une caractérisation par biologie moléculaire afin de confirmer leur nature. Les variants HbD-Punjab et HbO-Arab sont importants à distinguer des autres mutants du fait de leur implication dans des syndromes drépanocytaires majeurs de type hétérozygote composite S/D-Punjab ou S/O-Arab. En effet, l'HbD-Punjab stabilise le polymère d'HbS et l'HbO-Arab, tout comme l'HbC, favorise la polymérisation de l'HbS notamment par la déshydratation de l'érythrocyte. De rares mutants tels que l'HbS-Antilles (HBB:c.[20A>T;70G>A]) sont des doubles-mutants, c'est-à-dire qu'ils présentent deux mutations en *cis* dont la mutation  $\beta$ S (HBB :c.20A>T) ; actuellement une quinzaine sont décrits. Ces doubles mutants présentent la particularité d'être de diagnostic phénotypique difficile car la seconde mutation peut complètement modifier les propriétés physicochimiques de l'HbS. De plus, ils peuvent parfois, comme l'HbS-Antilles, favoriser la polymérisation et constituer un syndrome drépanocytaire majeur même à l'état hétérozygote [12]. Certain mutant, comme l'HbE fréquemment rencontré en Asie, présente aussi une propriété thalassémique comme décrit plus loin.

#### 4.2. Variants rares à l'origine de désordres hématologiques variés

La substitution d'acide aminé peut aussi affecter des résidus situés à l'intérieur de la molécule où elle a des conséquences dès lors qu'elle touche une zone fonctionnellement importante de la protéine. Ces variants sont plus difficilement mis en évidence par les recherches d'anomalie de l'Hb (électrophorèse et/ou chromatographie) car les substitutions ne modifient pas les charges de surface de la protéine et ne permettent pas systématiquement de les séparer de l'HbA. On distingue : i) les substitutions au niveau de la poche de l'hème qui entraînent une modification de l'affinité pour l'oxygène (augmentée ou diminuée) voire une Hb instable en cas de perte de l'hème et dans le cas des HbM, où le fer de l'hème est oxydé (Fe<sup>3+</sup>), une cyanose ; ii) les substitutions au niveau des zones contact des dimères ( $\alpha$ 1 $\beta$ 1) à l'origine d'Hb instable et celles au niveau des zones contacts entre chaînes  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 ou  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, siège de la transition allostérique, à l'origine d'Hb à affinité

modifiée pour l'oxygène ; iii) les substitutions au niveau de la cavité centrale qui peuvent affecter les sites de fixation du 2,3-DPG, à l'origine de variant avec affinité pour l'oxygène modifiée.

Les hémoglobines instables résultent donc potentiellement de 3 anomalies : modification localisée près de l'hème, modification localisée dans une zone de contact entre chaînes ou provoquée par des insertions ou des délétions au niveau d'une zone fonctionnelle importante. Ce sont le plus souvent des mutations privées conduisant à des phénotypes dominants résultant fréquemment de mutations *de novo*.

Les hémoglobines anormales avec affinité augmentée pour l'oxygène résultent de modification de structure qui perturbe l'équilibre allostérique, de modification de structure au voisinage de l'hème ou dans une région critique pour sa fonction, de modification touchant les régions où se lie le 2,3-DPG empêchant sa fixation. Les manifestations cliniques s'observent chez l'hétérozygote. Le caractère familial est fréquent mais les mutations *de novo* ne sont pas exceptionnelles. Les hémoglobines anormales avec affinité diminuée pour l'oxygène sont plus rares et résultent en général de modification de structure qui perturbe l'équilibre allostérique. Les HbM responsables de méthémoglobinémies résultent souvent de modification de structure au niveau des histidines distales (E7) ou proximales (F8, directement liées au fer de l'hème) des chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ . Il s'agit souvent de mutations *de novo*.

### 5. Bases moléculaires des thalassémies

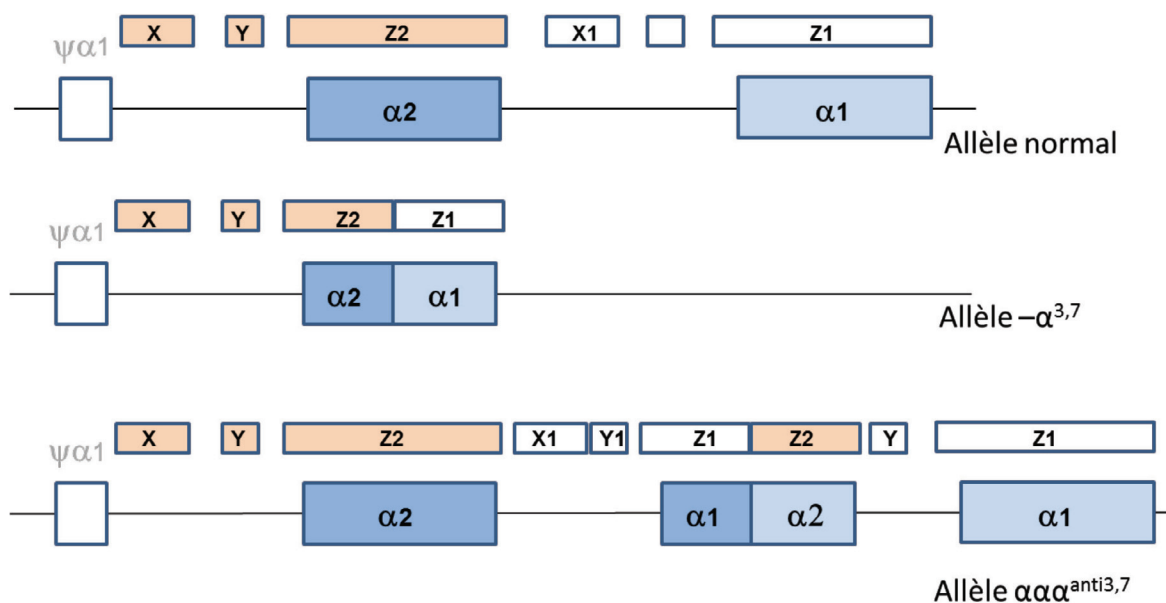
Les thalassémies constituent un groupe hétérogène d'anomalies moléculaires qui a en commun un défaut de synthèse d'une des chaînes de globine. Sur le plan physiopathologique, ces anomalies sont à l'origine d'un déséquilibre de synthèse avec accumulation de chaînes non appariées responsable de dysérythropoïèse. Nous nous intéressons ici essentiellement aux anomalies les plus fréquentes :  $\alpha$  et  $\beta$  thalassémies. Les thalassémies touchant les gènes  $\gamma$  ont une expression exclusivement anté- et néo-natale et ne seront pas détaillées ici. Celles touchant les gènes  $\delta$ , compte tenu de la faible expression de ce gène, sont sans conséquence pathologique.

#### 5.1. Alpha-thalassémies

Le défaut de synthèse des chaînes  $\alpha$ -globine a pour conséquence une diminution de production des différents types d'Hb dès la vie fœtale : HbF et HbA. Dans les régions tropicales d'Afrique ou d'Asie, les  $\alpha$ -thalassémies sont extrêmement fréquentes car les porteurs de trait  $\alpha$ -thalassémique, partiellement résistants à l'infection, ont subi une pression de sélection par le paludisme. Les anomalies moléculaires sont essentiellement des grandes délétions (50 différentes actuellement décrites), plus rarement des mutations ponctuelles (69 différentes décrites) (pour une liste exhaustive : <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>).

On distingue les délétions d'un gène  $\alpha$  ( $-\alpha$ ) responsable d' $\alpha$ +-thalassémie avec capacité résiduelle de synthèse de chaîne alpha, des délétions des 2 gènes  $\alpha$  en *cis* ( $--$ )

Figure 3 – Exemple d'une délétion responsable d' $\alpha^+$ -thalassémie.



Le déterminant  $\alpha$ -thalassémique le plus commun est la délétion  $-\alpha^{3,7}$ , avec un seul gène  $\alpha$  hybride fonctionnel. C'est une délétion de 3,7 kb produite par une recombinaison entre les segments homologues Z. De façon réciproque, cette recombinaison produit une tripllication des gènes  $\alpha$  fréquemment rencontrée :  $\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$  à laquelle n'est associée, de façon isolée, aucune propriété anormale.

Figure 4 – Classification et éléments diagnostiques des  $\alpha$ -thalassémies.

| Génotype                                           | Nombre de gènes $\alpha$ | Phénotype                            | HbBart's ( $\gamma 4$ )                                            | Données hématologiques                                         |
|----------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| $-\alpha/\alpha$<br>( $\alpha$ -thal hétérozygote) |                          | Porteur silencieux                   | 1 à 4% à la naissance                                              | Discrète microcytose<br>VGM=75-85fl                            |
| $-\alpha/-\alpha$<br>( $\alpha$ -thal homozygote)  |                          | Trait alpha-thalassémique            | Environ 10% à la naissance                                         | Discrète anémie<br>Hb=11-13 g/dl<br>Microcytose<br>VGM=65-75fl |
| $--/\alpha$<br>( $\alpha^0$ thal hétérozygote)     |                          |                                      |                                                                    |                                                                |
| $--/-\alpha$                                       |                          |                                      |                                                                    |                                                                |
| $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$                    |                          | HbH                                  | Environ 20 à 40% à la naissance<br>Puis HbH ( $\beta 4$ ): 3 à 30% | Anémie microcytaire régénérative                               |
| $--/\alpha^T\alpha$                                |                          | HbH ou<br>HbH <i>Hydrops fetalis</i> | Environ 20 à 40% à la naissance<br>Puis HbH ( $\beta 4$ ): 3 à 30% | Anémie ++ microcytaire régénérative                            |
| $--/--$                                            |                          | HbBart's <i>Hydrops fetalis</i>      | 100%                                                               | létal                                                          |



responsable d' $\alpha^0$ -thalassémie avec absence totale de synthèse de chaîne. La structure du cluster  $\alpha$ , avec 2 gènes  $\alpha$  présentant une très grande homologie de séquence, favorise les recombinaisons homologues non alléliques à l'origine des deux délétions  $\alpha^+$ -thalassémiques les plus fréquentes : une délétion de 3,7 kb ( $-\alpha 3,7$ ) (figure 3) et une de 4,2 kb ( $-\alpha 4,2$ ). L'association d'une  $\alpha$ -thalassémie aux variants les plus fréquents, HbS ou HbE ou HbC, en modifie l'expression phénotypique par diminution du taux d'expression du mutant (tableau 1). Parmi les délétions  $\alpha^0$ -thalassémiques emportant les 2 gènes  $\alpha$ , citons --SEA et --MED respectivement fréquentes dans le Sud Est Asiatique et le pourtour Méditerranéen. Dans de très rares cas, l' $\alpha^0$ -thalassémie est due à une délétion de la région régulatrice située environ 40-50 kb en amont des gènes  $\alpha$ -globine laissant les gènes  $\alpha$  intacts.

Les mutations ponctuelles au niveau des gènes  $\alpha$  responsables d' $\alpha$ -thalassémie sont notées  $\alpha T\alpha$  ou  $\alpha\alpha T$  en fonction du gène atteint (respectivement  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  globine). Les anomalies moléculaires rencontrées sont des mutations ponctuelles affectant, soit la maturation de l'ARNm (épissage, polyadénylation), soit la traduction (mutations non-sens, décalage du cadre de lecture, mutations du codon d'initiation) ou encore des mutations faux-sens affectant la stabilité et donnant lieu à une Hb instable. Ces formes d' $\alpha$ -thalassémies mutationnelles s'avèrent plus sévères que les formes délétionnelles. Deux hypothèses expliqueraient cela, d'une part dans les formes délétionnelles, le « détournement » des facteurs de transcription au niveau des promoteurs des gènes  $\alpha$  intacts favoriserait leur expression; d'autre part les chaînes  $\alpha$  mutées produites sont des éléments potentiellement instables et non solubles qui vont précipiter altérant l'érythropoïèse [13]. Sur le pourtour Méditerranéen, les mutations les plus fréquentes sont IVS-I(-5nt) (HBA2 : c.95+2\_95+6delTGAGG, en nomenclature internationale HGVS) qui est un défaut  $\alpha^+$ -thalassémique interférant avec l'épissage ou  $\alpha$  PA1(AATAAG) (HBA2 : c.\*94A>G) interférant avec le signal de polyadénylation. Fréquemment rencontré en Asie, le variant Hb Constant Spring (p.X143Gln) caractérisé par un allongement de la chaîne polypeptidique du fait d'une mutation du codon de terminaison est un variant instable de type thalassémique.

L'expression clinique des alpha-thalassémies est fonction essentiellement du nombre de gènes  $\alpha$  atteints mais aussi de la nature de l'anomalie moléculaire. Les atteintes  $\alpha$ -thalassémiques sont résumées dans la figure 4. La non-expression d'un gène  $\alpha$  est asymptomatique avec au maximum l'observation d'une microcytose. La non-expression de 2 gènes  $\alpha$  est dans la plupart des cas sans vraie conséquence pathologique puisqu'elle est juste associée à une discrète anémie avec microcytose franche. Le diagnostic est facilement fait à la naissance grâce à la présence d'HbBart's, constituée par l'excès des chaînes  $\gamma$  qui s'associent en un tétramère instable ( $\gamma 4$ ) et avec une très forte affinité pour l'oxygène. À l'âge adulte, le diagnostic biochimique sera présomptif devant les anomalies hématologiques et l'absence de carence martiale notamment. Dans le cadre d'un conseil génétique, il est nécessaire de réaliser un génotype afin de distinguer une  $\alpha^0$ -thalassémie

Tableau 1 : Effet de l'association d'une  $\alpha$ -thalassémie aux variants les plus fréquents (d'après [28]).

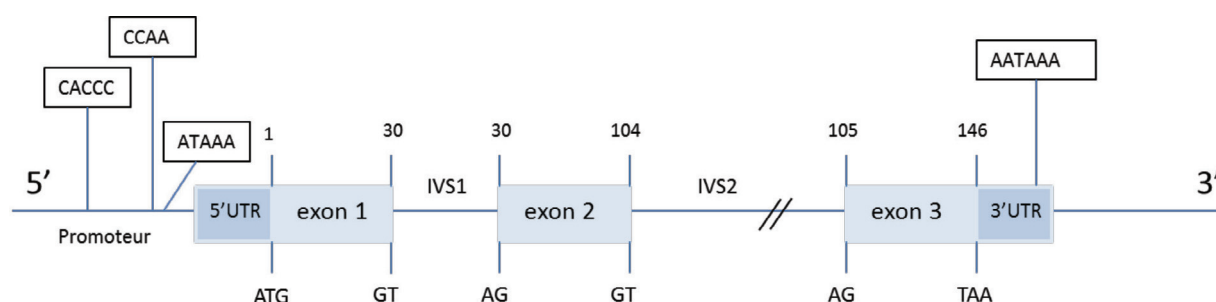
|                                        | AS      | AC      | AE      |
|----------------------------------------|---------|---------|---------|
| Normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) | 40 +/-2 | 43 +/-2 | 30 +/-2 |
| $\alpha\alpha/-\alpha$                 | 35 +/-2 | 37 +/-2 | 27 +/-2 |
| $-\alpha/-\alpha$ ou $--/\alpha$       | 28 +/-2 | 32 +/-2 | 22 +/-2 |
| $-\alpha/--$ (HbH)                     | 17      |         | 15      |

hétérozygote (délétion en *cis*) d'une  $\alpha^+$ -thalassémie homozygote (délétion en *trans*). En effet, seule l' $\alpha^0$ -thalassémie va constituer un risque génétique d'*hydrops foetalis*. La réduction à environ 25 % de la synthèse des chaînes  $\alpha$  (1 seul gène  $\alpha$  fonctionnel) est responsable d'hémoglobinose H. Le diagnostic peut être fait à la naissance par la présence d'un fort taux d'HbBart's et ensuite par la présence d'HbH, constituée d'un tétramère  $\beta 4$  instable, formé par l'excès de chaîne  $\beta$ . Le génotype doit être précisément caractérisé ; il est généralement hétérozygote composite, le plus fréquemment de type délétionnel, par exemple  $--SEA/-\alpha^{3,7}$ , ou plus rarement de type mixte par exemple  $--SEA/Constant Spring\alpha$ . Sur le plan clinique, les formes délétionnelles sont moins sévères que les formes non-délétionnelles [14]. Le génotype peut aussi être de type homozygote non-délétionnel avec des mutations  $\alpha$ -thalassémiques au niveau du gène  $\alpha 2$ -globine avec forte réduction de la synthèse des chaînes  $\alpha$ . Les 2 gènes  $\alpha 1$ -globine restant, intrinsèquement moins exprimés que les gènes  $\alpha 2$ -globine et ne bénéficiant pas du « détournement » de facteurs de transcription au niveau de leur promoteur, n'arrivent pas à compenser le déficit. L'absence d'expression des gènes  $\alpha$ , responsable d'un Hb-Bart's *hydrops foetalis* sévère, est létale. Dans de rares cas, un syndrome de type HbH *hydrops foetalis* peut être observé chez des enfants présentant un génotype hétérozygote composite associant un allèle sans gène  $\alpha$  et un allèle avec une mutation  $\alpha$ -thalassémique sévère.

## 5.2. Bêta-thalassémies

Le défaut complet de synthèse de chaîne  $\beta$ -globine, ou  $\beta^0$ -thalassémie, se caractérise par une absence totale de chaîne produite. Le défaut partiel, en fonction du degré de réduction,  $\beta^+$  ou  $\beta^{++}$  pour les défauts les moins sévères, se caractérise par une synthèse réduite de chaîne normale. Ce défaut de synthèse conduit à une accumulation de chaîne  $\alpha$ -globine en excès qui est à l'origine de la pathologie. Les chaînes  $\alpha$ -globine en excès, non associées en tétramères, précipitent dès le stade des précurseurs érythropoïétiques, entraînant la destruction intramédullaire des cellules et une érythropoïèse inefficace. Contrairement aux  $\alpha$ -thalassémies, les anomalies moléculaires sont essentiellement des mutations ponctuelles (300 différentes environ), plus rarement des délétions plus ou moins étendues (20 différentes environ) (<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>). Les mutations ponctuelles sont localisées sur toute l'étendue du gène. Toutes les différentes étapes de l'expression du gène peuvent être altérées. Ainsi, on observe des mutations affectant la transcription (mutation du promoteur), la maturation de l'ARNm (épissage, polyadénylation),

Figure 5 – Les différents types de mutations bêta-thalassémiques.



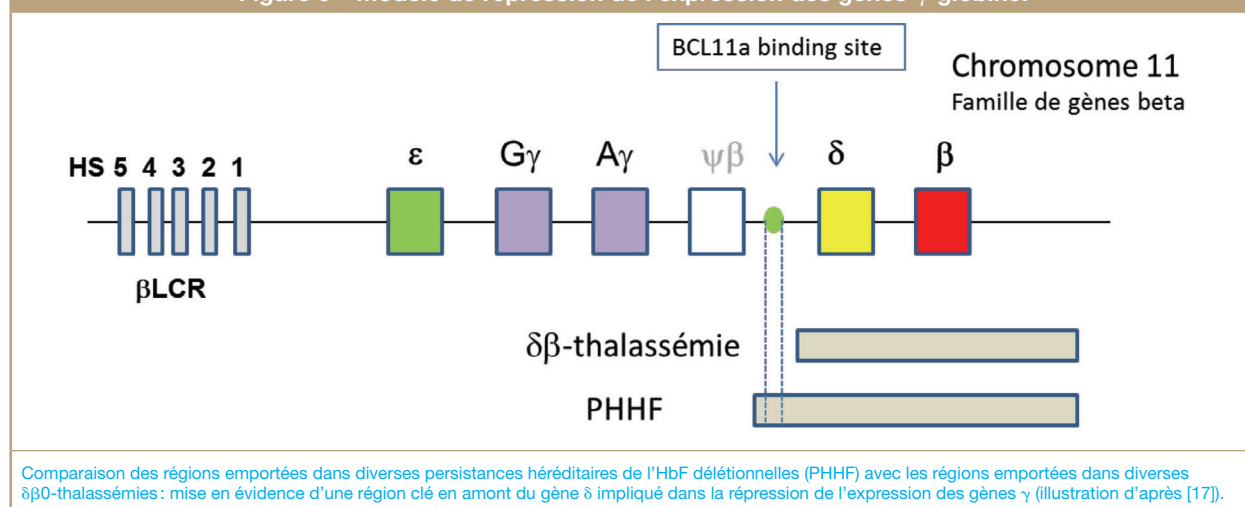
| Localisation de la mutation                                                  | Conséquence                       | Exemple Nomenclature HGVS                        | Nomenclature usuelle             |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------|
| Promoteur                                                                    | b <sup>+</sup> ou b <sup>++</sup> | HBB:c.-138C>T                                    | -88 (C->T)                       |
| 5'UTR et 3'UTR                                                               |                                   | HBB :c.*110T>C                                   | Poly A (T->C) ; AATAAA->AACAAA   |
| Codon initiation                                                             | b <sup>°</sup>                    | HBB:c.3G>T                                       | Codon 0 ATG->ATT                 |
| Exon 1 et 2 (mutation non-sens ou mutation par décalage du cadre de lecture) | b <sup>°</sup>                    | HBB:c.118C>T                                     | Codon 39 (C->T)                  |
| Exons 3 (mutation non-sens ou mutation par décalage du cadre de lecture)     | b <sup>+</sup> dominante          | HBB:c.343_344delinsG                             | Codon 114 (-CT; +G)              |
| Jonction intron/exons                                                        | b <sup>°</sup> ou b <sup>+</sup>  | HBB:c.92+1G>A (b <sup>°</sup> )<br>HBB:c.92+6T>C | IVS-I-1 (G->A)<br>IVS-I-6 (T->C) |
| mutation exonique créant un site alternatif d'épissage                       | b <sup>+</sup>                    | HBB:c.75T>A<br>HBB:c.79G>A                       | Codon 24 (T->A)<br>HbE           |
| Mutation intronique créant un site alternatif d'épissage                     | b <sup>+</sup>                    | HBB:c.93-21G>A (b <sup>+</sup> sévère)           | IVS1-110 (G>A)                   |

HGVS : Human genome variation society ; liste non exhaustive (<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>).

la traduction (mutation non-sens, décalage du cadre de lecture, mutation du codon d'initiation) ou encore des mutations faux-sens affectant la stabilité donnant lieu à une Hb instable. Les différentes mutations rencontrées sont classées en fonction du niveau d'altération de la synthèse :  $\beta^0$ ,  $\beta^+$  ou  $\beta^{++}$  (figure 5). Parmi les défauts  $\beta^+$ -thalassémiques, on distingue les défauts sévères qui sont associés à un taux résiduel d'HbA < 5 % (par exemple, IVS1-110 (G>A) qui est fréquent en région Méditerranéenne) et les défauts moins sévères avec des taux résiduels d'HbA entre 6 à 30 % [15]. Certaines hémoglobinopathies qualitatives sont aussi des thalassémies. Ainsi, le variant HbE présente une mutation faux-sens qui affecte un acide aminé de surface mais qui crée aussi au niveau de l'exon 1 un site alternatif d'épissage, partiellement utilisé, qui dévie une partie de l'ARNm vers une maturation anormale, aux dépens de la production d'ARNm normal. Ainsi les sujets hétérozygotes AE ne présentent pas un taux attendu d'expression de 40 % comme pour les autres variants  $\beta$ , mais de seulement 30 % environ en l'absence d' $\alpha$ -thalassémie associée. De rare variant  $\beta$ -thalassémique, tout particulièrement des mutations par décalage du cadre de lecture ou mutation non-sens au niveau du 3<sup>e</sup> exon du gène sont susceptibles de donner une chaîne d'Hb raccourcie ou

allongée incapable de former des tétramères stables. Le système NMD (« nonsense mediated mRNA decay ») est un processus normalement présent permettant de dégrader sélectivement les ARNm portant un codon Stop prématuré empêchant ainsi la traduction d'une protéine tronquée, potentiellement délétère. Cependant, ce système n'est pas fonctionnel pour les codons Stop prématuré ou décalé survenant sur le dernier exon d'un gène. Ces variants sont difficilement mis en évidence par l'analyse phénotypique du fait de leur grande instabilité et sont associés à une anémie hémolytique même à l'état hétérozygote. On parle de  $\beta$ -thalassémie intermédiaire de type dominant (effet dominant négatif).

Les formes de  $\beta$ -thalassémies dues à des délétions sont plus rares mais pas exceptionnelles [16]. On distingue schématiquement les délétions emportant le gène  $\beta$  et les très rares délétions conservant intact le gène  $\beta$  mais délétant le LCR. Les délétions emportant le gène  $\beta$  se divisent en deux groupes : les délétions réduites au gène  $\beta$  sont des défauts moléculaires responsables de  $\beta^0$ -thalassémie et les délétions englobant le ou les gènes en amont de  $\beta$  ( $\delta$ ,  $\gamma$  voire  $\epsilon$ ) sont responsables de  $G\gamma A\gamma(\delta\beta)^0$ ,  $G\gamma(A\gamma\delta\beta)^0$  ou encore de  $(\epsilon G\gamma A\gamma\delta\beta)^0$ -thalassémie pour les plus grandes. Les délétions réduites au gène  $\beta$  ont des tailles qui varient

Figure 6 – Modèle de répression de l'expression des gènes  $\gamma$ -globine.

de 105 bp à 67 kb. Certaines de ces délétions se limitent au promoteur du gène  $\beta$ , et à l'état hétérozygote, on observe sur le plan phénotypique une très forte élévation de l'HbA2 (HbA2 de 6 à 10 %) associée à une augmentation modérée de l'HbF. Ceci s'expliquerait probablement par un recrutement accru des facteurs de transcriptions au niveau des gènes en amont notamment le gène  $\delta$ . Les plus larges délétions, englobant  $\delta$ ,  $\beta$  voire  $\gamma$ , sont respectivement des  $(\delta\beta)^0$ -thalassémies et  $(A\gamma\delta\beta)^0$ -thalassémies. Les sujets hétérozygotes présentent un phénotype de trait  $\beta$ -thalassémique (microcytose et hypochromie) mais avec des taux d'HbA2 normaux et des taux d'HbF augmentés (entre 5 à 15 % environ). Certaines sont relativement fréquentes dans certaines régions par exemple, la  $(\delta\beta)^0$ -thalassémie Sicilienne en Italie. Les sujets hétérozygotes pour les rares délétions de type  $(\epsilon\gamma\delta\beta)^0$ -thalassémie, qui sont toujours sporadiques et familiales, présentent aussi un phénotype de trait  $\beta$ -thalassémique mais avec des taux d'HbA2 et d'HbF normaux. À noter que durant la période anténatale et néo-natale, les sujets hétérozygotes présentent une anémie qui peut être sévère parfois transfusion-requérante. L'anémie va s'améliorer à partir de l'âge de 3 à 6 mois. Ces formes n'ont jamais été identifiées à l'état homozygote car elles sont probablement létales. Les persistances héréditaires de l'HbF (PHHF) de type délétionnelles sont aussi dues à des délétions des gènes  $\delta$  et  $\beta$ . Cependant les sujets hétérozygotes pour une PHHF présentent des taux d'HbF plus augmentés (entre 20 à 30 % environ) mais sans microcytose ni anémie. Des publications récentes démontrent qu'une région d'environ 3 kb située en 5' du gène  $\delta$  joue un rôle majeur dans la répression de l'expression des gènes  $\gamma$  (« BCL11a binding site ») [17]. Schématiquement, la perte de cette région est associée à une persistance dans l'expression de l'HbF qui permettrait de compenser la perte du gène  $\beta$  et expliquerait en partie les différences de phénotype entre PHHF et  $(\delta\beta)^0$ -thalassémie (figure 6). À noter, qu'il existe également des PHHF mutationnelles dues à des mutations ponctuelles au niveau des promoteurs des gènes  $G\gamma$  et  $A\gamma$  [8]. Une mention particulière peut être faite pour l'Hb-Lepore, qui est issue d'un gène de fusion suite à une

recombinaison entre les gènes  $\delta$  et  $\beta$ . Le produit du gène de fusion  $\delta/\beta$  est une protéine hybride dont la synthèse est quantitativement réduite, parce que placée sous la dépendance du promoteur faible  $\delta$ , et qui présente une propriété  $\beta$ -thalassémique.

Bien que l'hétérogénéité moléculaire soit très importante, l'expression clinique, du fait de la physiopathologie commune est relativement semblable (anémie, microcytose...). Cependant, la sévérité de l'expression clinique des bêta-thalassémies va dépendre du type d'allèle ( $\beta^0$ ,  $\beta+$ ,  $\beta++$ ), de l'association avec une  $\alpha$ -thalassémie (qui permet de diminuer le pool de chaîne  $\alpha$  libre) et de la capacité à produire de façon persistante des chaînes  $\gamma$ . La transmission est normalement récessive, seuls de rares cas de type dominant, comme cité plus haut, existent. À noter qu'une perte d'hétérozygotie en mosaïque de la région chromosomique où se situe le gène  $\beta$ , par délétion segmentaire ou par isodisomie uniparentale, permet d'expliquer le développement progressif au cours de la vie d'une  $\beta$ -thalassémie majeure ou intermédiaire chez des patients constitutionnellement  $\beta$ -thalassémiques hétérozygotes [18,19].

## 6. Indications du diagnostic moléculaire

Les indications de diagnostic moléculaire sont limitées à la réalisation préalable d'une analyse phénotypique précise de l'Hb [20;21]. Il existe trois grandes catégories de pathologies sévères qui vont nécessiter une confirmation moléculaire, un conseil génétique et possiblement un diagnostic prénatal (tableau 2) [22]:

- Syndrome bêta-thalassémique (mutation bêta-thalassémique au sens large incluant les mutations ponctuelles, les  $\delta\beta$ -thalassémies, Hb-Lepore et HbE...).
- Syndrome drépanocytaire majeur : homozygote S, forme la plus fréquente, tout particulièrement lorsque l'étude familiale n'a pu être réalisée ; mais aussi les patients hétérozygotes composites de type S/ $\beta^0$ thalassémie, S/ $\beta+$ thalassémie, S/D-Punjab, S/O-Arab, S/E ou les rares hétérozygoties symptomatiques type A/Santilles.

Tableau 2 – Génomotype des parents à l'origine d'une hémoglobinopathie pathologique chez l'enfant (adapté d'après [22]).

|                      | Présent chez la mère |     |     |            |          |        |     |         |         |
|----------------------|----------------------|-----|-----|------------|----------|--------|-----|---------|---------|
|                      |                      | HbS | HbC | HbD-Punjab | HbO-Arab | β-thal | HbE | α0-thal | α+-thal |
| Présent chez le père | HbS                  |     |     |            |          |        |     |         |         |
|                      | HbC                  |     |     |            |          |        |     |         |         |
|                      | HbD-Punjab           |     |     |            |          |        |     |         |         |
|                      | HbO-Arab             |     |     |            |          |        |     |         |         |
|                      | β-thal               |     |     |            |          |        |     |         |         |
|                      | HbE                  |     |     |            |          |        |     |         |         |
|                      | α0-thal              |     |     |            |          |        |     |         |         |
|                      | α+-thal              |     |     |            |          |        |     |         |         |
|                      |                      |     |     |            |          |        |     |         |         |

Syndrome drépanocytaire majeur
  Thalassémie majeure ou intermédiaire
  HbBart's hydrops foetalis ou HbH

- Syndrome HbBart's *hydrops foetalis* (mutation α<sup>0</sup>-thalassémique) et les HbH.

La caractérisation moléculaire de sujets hétérozygotes est indiquée dans le cadre du conseil génétique. Par exemple il est important de distinguer parmi les sujets porteurs d'un trait α-thalassémique, les couples porteurs de mutation α<sup>0</sup>-thalassémique et donc à risque d'*hydrops foetalis*.

La caractérisation moléculaire de sujets hétérozygotes, en dehors du conseil génétique, est indiquée dans le cas d'hémoglobinopathie complexe où l'analyse phénotypique n'est pas concluante, dans le cas de recherche de variants difficilement visible au phénotype avec point d'appel clinique (recherche de mutants à affinité modifiée pour l'oxygène, mutants instables...).

## 7. Méthodes utilisées pour le diagnostic moléculaire

Les techniques utilisées pour la caractérisation moléculaire des anomalies de l'Hb sont les mêmes que pour l'étude de n'importe quel autre gène. Le diagnostic moléculaire des hémoglobinopathies utilise de l'ADN génomique. Le consentement écrit du patient (ou des parents pour un mineur) ou l'attestation de consultation de génétique

rédigée par le médecin prescripteur (décret n° 2008-321 du 4 avril 2008) est indispensable pour la réalisation de ces analyses par les laboratoires de référence.

Pour le diagnostic post-natal, le matériel de base utilisé pour l'extraction d'ADN est le plus souvent du sang total prélevé sur tube EDTA. À noter, sur le plan pratique, que les érythrocytes étant dépourvus de noyau cellulaire, une transfusion de culots globulaires n'empêche pas la réalisation d'une étude moléculaire contrairement à l'étude phénotypique. Pour le diagnostic prénatal, l'ADN est extrait à partir de cellules trophoblastiques obtenues après ponction du trophoblaste entre 11 et 13 semaines d'aménorrhée (SA) ou à partir de cellules amniotiques obtenues après prélèvement de liquide amniotique réalisé à partir de 15-16 SA et possible jusqu'au terme. Ces prélèvements sont invasifs et comportent un risque de fausses couches de 0,5 à 2 %. Le diagnostic est direct et consiste à rechercher chez le fœtus la présence d'une ou de deux mutations préalablement identifiées, chez les parents ou un autre cas index.

La recherche de mutation ponctuelle peut être réalisée selon deux grands cadres : la recherche spécifique de mutations (par exemple hybridation par « *reverse dot blot* », restriction enzyme-PCR, analyse des courbes de fusion à haute résolution ou HRM, PCR digitale) ou la recherche



systématique de mutations (séquençage Sanger, pyro-séquençage, séquençage nouvelle génération ou NGS). Parmi les techniques les plus couramment utilisées, on peut citer : le « *reverse dot blot* » et le séquençage Sanger. Ces deux techniques s'appuient sur la réalisation préalable de PCR (« *polymerase chain reaction* ») afin d'amplifier sélectivement les gènes de globine. Le « *reverse dot blot* » utilise une membrane où sont fixés plusieurs oligonucléotides allèle-spécifiques correspondant aux différentes mutations recherchées. La technique repose sur l'hybridation spécifique d'amplicons obtenus par une PCR Multiplex à ces oligonucléotides allèle-spécifiques permettant la mise en évidence de mutation. Cette technique est relativement peu onéreuse et ne nécessite pas de matériel complexe [23;24]. Des réactifs commerciaux existent permettant l'utilisation de mix et d'amorces fournis par le fabricant. Lorsque le laboratoire dispose d'un séquenceur automatique, le séquençage complet par la technique de Sanger des gènes de globine est relativement simple compte tenu de la petite taille de ces gènes (< 2 kb). Le séquençage systématique est relativement plus coûteux, nécessite du matériel spécifique mais présente l'avantage de mettre en évidence toutes les mutations ponctuelles. À noter que pour les gènes  $\alpha$ , qui sont dupliqués et donc très homologues, le séquençage différentiel des gènes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ou d'un gène  $\alpha$ -hybride ( $\alpha 2/\alpha 1$ ) nécessite l'utilisation d'amorces très spécifiques.

De façon similaire, la recherche de grands réarrangements tels que les délétions  $\alpha$ -thalassémiques par exemple, peut être réalisée selon deux grands cadres : la recherche spécifique de délétions (southern-blot, Gap-PCR) ou la recherche systématique de réarrangements (qPCR, MLPA, CGH-array, NGS). La Gap PCR est une technique largement utilisée pour diagnostiquer des réarrangements qui sont bien définis au préalable [25;26]. En effet, cette technique est basée sur l'amplification spécifique du point de cassure. Elle nécessite des contrôles positifs et négatifs. L'analyse est simple et la technique peu

coûteuse mais elle est limitée aux seuls réarrangements recherchés et connus. La MLPA (« *multiplex ligation-dependent probe amplification* ») est une technique semi-quantitative qui permet l'identification de grand réarrangement. Elle est basée sur l'utilisation d'une paire d'amorces très proches (quelques nucléotides les séparent) qui après une étape d'hybridation et de ligation va devenir un fragment de taille connu destiné à être amplifié. Plusieurs paires d'amorces sont disposées sur toute l'étendue du cluster et vont pouvoir être amplifiées simultanément. L'amplification n'aura lieu que si les étapes préalables d'hybridation et de ligation ont pu être faites. La présence d'une délétion ne permet pas la ligation et donc ne permet pas l'amplification. Une quantification relative des fragments obtenus pour chaque couple d'amorces permet la mise en évidence de réarrangements aussi bien des délétions que des duplications, des triplications... [27]. Plusieurs kits commerciaux existent.

## 8. Conclusion

Les gènes des Hbs sont les premiers gènes à avoir été identifiés. Ce sont des petits gènes mais dont l'intrication ( $\alpha/\gamma$  et  $\alpha/\beta$ ) et le nombre d'anomalies décrites complexifient l'analyse. L'analyse phénotypique précise, incluant une numération globulaire, est un préalable indispensable à l'analyse moléculaire. L'étude des gènes de globine n'est pas différente de celle des autres gènes et est en évolution avec l'émergence de nouvelles technologies telles que le séquençage de nouvelle génération (NGS). Ces nouvelles technologies apportent notamment la possibilité de développer prochainement, après validation, des diagnostics prénatals non invasifs, c'est-à-dire à partir de l'ADN fœtal circulant.

**Conflits d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

## Références

- [1] Williams, T. N. & Weatherall, D. J. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a011692 (2012).
- [2] Labie, D. & Elion, J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC - Hématologie* 2, 220-239 (2005).
- [3] Higgs, D. R. & Wood, W. G. Long-range regulation of alpha globin gene expression during erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 15, 176-183 (2008).
- [4] Li, Q., Peterson, K. R., Fang, X. & Stamatoyannopoulos, G. Locus control regions. *Blood* 100, 3077-3086 (2002).
- [5] Xu, J. et al. Transcriptional silencing of {gamma}-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev.* 24, 783-798 (2010).
- [6] Molchanova, T. P., Pobedinskaya, D. D. & Huisman, T. H. The differences in quantities of alpha 2- and alpha 1-globin gene variants in heterozygotes. *Br. J. Haematol.* 88, 300-306 (1994).
- [7] Kihm, A. J. et al. An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin. *Nature* 417, 758-763 (2002).
- [8] Hanna, N., Parfait, B., Vidaud, D. & Vidaud, M. [Mutation mechanisms and their consequences]. *Med Sci (Paris)* 21, 969-980 (2005).
- [9] Giardine, B. et al. Systematic documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach. *Nat. Genet.* 43, 295-301 (2011).
- [10] Forget, B. G. & Bunn, H. F. Classification of the Disorders of Hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a011684 (2013).
- [11] Pauling, L. & Itano, H. A. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* 110, 543-548 (1949).
- [12] Monplaisir, N. et al. Hemoglobin S Antilles: a variant with lower solubility than hemoglobin S and producing sickle cell disease in heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9363-9367 (1986).
- [13] Fucharoen, S. & Viprakasit, V. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. *Hematology* 2009, 26-34 (2009).
- [14] Vichinsky, E. P. Clinical Manifestations of  $\alpha$ -Thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a011742 (2013).
- [15] Thein, S. L. The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a011700 (2013).
- [16] Pissard, S. et al. Characterization of three new deletions in the  $\beta$ -globin gene cluster during a screening survey in two French urban areas. *Clin. Chim. Acta* 415, 35-40 (2013).
- [17] Sankaran, V. G. & Orkin, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a011643 (2013).

- [18] Badens, C. et al. A novel mechanism for thalassaemia intermedia. *Lancet* 359, 132–133 (2002).
- [19] Chang, J.-G. et al. {beta}-thalassemia major evolution from {beta}-thalassemia minor is associated with paternal uniparental isodisomy of chromosome 11p15. *Haematologica* 93, 913–916 (2008).
- [20] Aguilar-Martinez, P. et al. [Flowcharts for the diagnosis and the molecular characterization of hemoglobinopathies]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 68, 455–464 (2010).
- [21] Traeger-Synodinos, J. et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet* 23, 560 (2015).
- [22] Bain, B. J. Neonatal/newborn haemoglobinopathy screening in Europe and Africa. *J. Clin. Pathol.* 62, 53–56 (2009).
- [23] Maggio, A. et al. Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean beta-thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood* 81, 239–242 (1993).
- [24] Puehringer, H. et al. Validation of a reverse-hybridization StripAssay for the simultaneous analysis of common  $\alpha$ -thalassemia point mutations and deletions. *Clinical Chemical Laboratory Medicine* 45, 605–610 (2007).
- [25] Craig, J. E., Barnetson, R. A., Prior, J., Raven, J. L. & Thein, S. L. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood* 83, 1673–1682 (1994).
- [26] Liu, Y. T. et al. Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. *Br. J. Haematol.* 108, 295–299 (2000).
- [27] Harteveld, C. L. et al. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *J. Med. Genet.* 42, 922–931 (2005).
- [28] Bunn, H. F. & Forget, B. G. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. (W.B. Saunders Company, 1986).

# La drépanocytose en France

Sarah Mattioni<sup>a\*</sup>, Katia Stankovic Stojanovic<sup>a</sup>, Robert Giro<sup>a</sup>, François Lionnet<sup>a</sup>

## RÉSUMÉ

La drépanocytose est une maladie monogénique de transmission autosomique récessive. Elle résulte d'une mutation ponctuelle du sixième codon du gène de la  $\beta$ -globine qui entraîne une polymérisation de l'hémoglobine mutée (HbS) en situation désoxygénée. L'HbS est à l'origine de l'hémolyse et des phénomènes vaso-occlusifs. C'est la première maladie génétique en France et dans le monde. Du fait des progrès des traitements et de l'allongement de l'espérance de vie des malades la prévalence de cette maladie est en constante augmentation et elle a été reconnue comme priorité de santé publique par les autorités de santé nationales et internationales. Au cours de cette maladie chronique émaillée de complications aiguës, le biologiste intervient à différentes étapes de la prise en charge du malade (établissement du diagnostic, suivi du traitement, dépistage de certaines complications et diagnostic prénatal).

**Complications aiguës et chroniques – drépanocytose – hémoglobinopathie héréditaire – transfusion – hydroxyurée.**

## 1. Introduction

La drépanocytose est une maladie génétique de l'hémoglobine se transmettant sur un mode autosomique récessif. Elle résulte d'une mutation ponctuelle du 6<sup>e</sup> codon du gène  $\beta$ -globine (chromosome 11). Cette mutation est responsable de la synthèse d'une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S (HbS), qui, à l'état désoxygéné, peut polymériser. Cette polymérisation des molécules d'hémoglobine mutées dans les globules rouges (GR) drépanocytaires est à l'origine d'une fragilisation et d'une perte de plasticité de ces hématies responsable de l'hémolyse et des phénomènes vaso-occlusifs. La mutation génétique impliquée dans la synthèse d'hémoglobine anormale associée à la drépanocytose serait apparue il y a 70 000 à 150 000 ans au sein de populations d'Afrique subsaharienne, fortement exposées au paludisme, en conférant au porteur sain qui possède une seule copie du gène muté une protection contre les formes létales du paludisme [1,2]. La prévalence des porteurs sains du trait drépanocytaire (AS) est d'environ 2 % à l'échelle mondiale [3] et peut atteindre jusqu'à 25-30 % de la population de certaines zones d'Afrique intertropicale [4,5].

<sup>a</sup> Médecine Interne, Centre de référence de la Drépanocytose  
CHU Tenon  
4, rue de la Chine  
75020 Paris

\*Correspondance :  
sarah.mattioni@aphp.fr

article reçu le 21 janvier, accepté le 2 février 2016  
© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

## SUMMARY

### Sickle Cell Disease in 2016

Sickle cell disease (SCD) is a monogenic autosomal recessive disorder. It is the result of a single point mutation in the  $\beta$ -globin gene producing the abnormal Haemoglobin S (HbS). Deoxygenation of SS erythrocytes leads to polymerization of SS hemoglobin causing hemolysis and vaso-occlusion. It is the most common genetic disease in the world. In the last decades, the care of patients with SCD has undergone important advances and life expectancy has risen dramatically. World Health Organization (WHO) and United Nations have recognized SCD as a public health priority. Currently, SCD is a multisystem chronic disease with episodes of acute complications. Biologist is involved in diagnosis, prenatal diagnosis, follow-up, monitoring of treatment, detection of complications.

**Acute and chronic complications – Sickle cell disease – Sickle cell anemia – transfusion therapy – hydroxyurea.**

Il existe plusieurs formes génétiques de syndromes drépanocytaires majeurs [5,6] :

-Homozygotie SS: la plus fréquente (> 70 % des syndromes drépanocytaires majeurs, SDM) [4] et la plus grave.

-Hétérozygoties composées :

\*S $\beta^0$  : Hb S associée à une mutation  $\beta$ -thalassémique entraînant une absence de synthèse d'HbA normale.

\*S $\beta^+$  : Hb S associée à une mutation  $\beta$ -thalassémique permettant la persistance d'une quantité variable d'HbA.

\*SC: mutation S et mutation C, il s'agit du deuxième SDM par ordre de fréquence.

\* Autres formes plus rares : SE, SD Punjab, S Antilles, SO Arab, SC Harlem....[7].

## 2. Épidémiologie

La drépanocytose, particulièrement fréquente en Afrique subsaharienne, est présente également dans le pourtour méditerranéen (Maghreb, Italie du Sud, Grèce), au Moyen Orient, en Inde. Sa distribution initiale était superposée aux zones d'impaludation. A la suite des mouvements de population la drépanocytose s'est répandue en Europe, en Méditerranée, aux Antilles, en Amérique du Nord et du Sud. La drépanocytose est répartie de façon hétérogène en métropole mais elle est en incidence la première maladie génétique en France comme dans le monde. Elle a été reconnue comme une priorité de santé publique en 2004 en France, par l'OMS en 2006 et par l'ONU en 2008 [8]. On estime que 312 000 enfants drépanocytaires naissent chaque année dans le monde [4]. En France en 2014,

485 SDM ont été dépistés. L'incidence moyenne de la drépanocytose en métropole était de 1/2.364 en 2010, les trois-quarts des malades étant concentrés dans la région Ile-de-France [8].

Alors qu'avant les années 70 très peu d'enfants survivaient au delà de l'âge de 10 ans [4], dans les pays à haut revenu une amélioration de la survie a été rendue possible par la mise en œuvre du dépistage néonatal, la prévention et le traitement des complications aiguës notamment des infections. Aux États-Unis, la mortalité infantile a pu être diminuée d'un facteur 10 et plus de 95 % des enfants dans les pays développés atteignent l'âge adulte [8]. En France aussi l'espérance de vie des drépanocytaires s'est considérablement améliorée et l'âge médian au décès a doublé entre la période 1979-1986 et 2003-2010 [9].

### 3. Physiopathologie

La mutation sur le codon 6 du gène de la  $\beta$ -globine conduit au remplacement de l'acide glutamique hydrophile par une valine hydrophobe qui est responsable d'un changement de conformation de l'hémoglobine mutée (HbS) en situation de désoxygénation, par exemple à la faveur du passage dans la microcirculation. Un polymère se forme et s'allonge provoquant la déformation caractéristique des globules rouges en forme de faucille (falciformation) [6,10]. La polymérisation de l'HbS dépend de l'importance de la désoxygénation, de la composition de l'hémoglobine (la présence d'hémoglobine fœtale (HbF) diminue la polymérisation), de la température, de l'équilibre ionique, du pH du globule rouge, de la concentration en 2,3-diphosphoglycérate (2-3 DPG) et de la présence d'une  $\alpha$ -thalassémie [5-7]. La formation de ces grandes fibres de polymères entraîne une cascade d'autres anomalies cellulaires qui participent du mécanisme physiopathologique : dérégulation de l'homéostasie des cations, libération de  $\text{Fe}^{3+}$  responsable d'un microenvironnement oxydant, exposition anormale des phosphatidylsérines à la surface des GR favorisant l'activation de la coagulation, les phénomènes d'adhérence et la reconnaissance des GR par les macrophages [5,10]. Ces différents phénomènes sont responsables de l'anémie hémolytique et d'une perte de déformabilité des GR. Le processus initial est réversible mais devient irréversible si les conditions environnementales se pérennisent [6]. Les différents événements évoqués ci-dessus s'ils rendent bien compte de la physiopathologie de la maladie, n'expliquent pas le déclenchement de la crise vaso-occlusive (CVO). En effet, en conditions basales, le temps nécessaire à la polymérisation de la désoxy-HbS (« *delay time* ») est supérieur au temps de passage du GR dans la microcirculation. Divers mécanismes sont susceptibles de précipiter les CVO via un ralentissement du flux circulatoire [10].

- adhésion des globules rouges SS à l'endothélium (en particulier réticulocytes de stress ou GR jeunes sortis de façon prématurée de la moelle osseuse et qui expriment des molécules d'adhésion),
- intervention également des leucocytes et plaquettes activées dans le ralentissement du flux sanguin,
- augmentation du tonus vasculaire entraînant un ralentissement du flux sanguin lié à une diminution du monoxyde d'azote (NO) et à une augmentation de l'endothéline-1 (ET1).

Le déficit en NO est responsable également de l'activation des plaquettes et majore le dysfonctionnement endothélial. La conjonction de ces différents mécanismes est responsable de la vaso-occlusion.

### 4. Clinique

#### 4.1. Drépanocytose homozygote (SS)

Il s'agit de la forme la plus fréquente des syndromes drépanocytaires majeurs.

##### 4.1.1 Histoire naturelle [11]

Il existe une grande variabilité d'expression phénotypique de la maladie d'un patient à l'autre et durant la vie du patient. Ceci tient à des facteurs génétiques (concentration d'HbF et existence d'une  $\alpha$ -thalassémie associée) et à des facteurs environnementaux [5,7].

On peut subdiviser l'histoire naturelle en quatre périodes :

- Période néonatale (0-3 mois) asymptomatique étant donné la présence d'Hb F.
- Petite enfance (3- 5 ans) : période où la morbi-mortalité est importante en raison du risque infectieux (en particulier septicémie à pneumocoque qui justifie dans cette tranche d'âge la prophylaxie par la pénicilline) et du risque d'anémie aiguë (en raison d'épisodes de séquestration splénique et d'érythroblastopénie). Les crises douloureuses à cet âge consistent en des dactylites (syndromes pieds-mains correspondant à des tuméfactions inflammatoires et douloureuses des mains et pieds).
- Seconde enfance marquée par les CVO, l'apparition des syndromes thoraciques et le risque de survenue d'une vasculopathie cérébrale.
- Âge adulte dont nous allons décrire ci-dessous les complications aiguës et chroniques. Les complications anémiques et infectieuses passent au second plan derrière les CVO (1<sup>re</sup> cause d'hospitalisation) [12] et les syndromes thoraciques aigus (1<sup>re</sup> cause de mortalité chez l'adulte jeune).

##### 4.1.2. Complications aiguës

- Crises vaso-occlusives : les CVO osseuses se manifestent par des douleurs osseuses très intenses touchant la métaphyse et la diaphyse des os longs. C'est l'évènement aigu le plus fréquent chez le patient drépanocytaire [5]. Des signes inflammatoires locaux et généraux (fièvre ne dépassant généralement pas 38,5 °C) peuvent exister mais doivent faire rechercher une infection [5]. La durée de la crise est variable allant de quelques heures à plusieurs jours (7 jours en moyenne chez l'adulte hospitalisé) [13]. Il faut rechercher les facteurs favorisant qui peuvent être de nature très variée : variation climatique, stress physique ou psychologique, apnée du sommeil, prise de médicaments (corticoïdes, vasoconstricteurs) ou d'alcool, effort intense ou prolongé, infection, déshydratation, période des règles chez certaines femmes... Chez le petit enfant, il peut exister des CVO abdominales, chez l'adulte par contre cette manifestation est exceptionnelle et doit faire rechercher une autre cause à la douleur [13].



- Syndrome thoracique aigu (STA) : il s'agit de la 2<sup>e</sup> complication aiguë chez l'adulte drépanocytaire en terme de fréquence [5]. Il est défini par l'association d'un nouvel infiltrat radiologique à un ou plusieurs symptômes respiratoires : toux, douleur thoracique, dyspnée, expectoration (en particulier les crachats jaunes d'or), anomalie auscultatoire. En pratique clinique tout signe physique respiratoire est un syndrome thoracique jusqu'à preuve du contraire [14].

- Autres complications vaso-occlusives : les complications ischémiques secondaires à la vaso-occlusion peuvent toucher la plupart des organes. Elles sont nombreuses : priapisme, accidents vasculaires cérébraux, crises vaso-occlusives hépatiques, spléniques (infarctus ou séquestration), rénales (hématurie micro- ou macroscopique liées à un infarctus rénal ou une nécrose papillaire), vertige aigu ou surdité brusque [11,14].

- Complications infectieuses : l'infection est une complication fréquente de la drépanocytose. Classiquement, les infections à germes encapsulés (pneumocoque, *Haemophilus influenzae*, méningocoque) et salmonelles mineures favorisées par l'asplénie fonctionnelle doivent être évoquées. Il faut redouter les infections liées aux soins (staphylocoques et entérobactéries) [14].

#### 4.1.3. Complications chroniques

Elles sont nombreuses, variées (atteintes neurosensorielles, rénales, cardio-pulmonaire, hépatopathies, lithiases vésiculaires, ulcères cutanés, ostéonécroses...) et peuvent mettre en jeu le pronostic vital et fonctionnel. Nous ne nous attarderons que sur les plus graves :

- La vasculopathie cérébrale concerne principalement les patients SS et S $\beta$ 0. Il s'agit d'une atteinte sténosante des vaisseaux de gros et moyens calibres des territoires antérieurs, à l'origine d'accidents ischémiques. Dans un second temps, se constitue un réseau de suppléance anastomotique fragile, à l'origine d'accidents hémorragiques. Cette vasculopathie cérébrale chronique s'appelle Moya-Moya [5,14,15].

- La rétinopathie : c'est une complication fréquente qui concerne 64 % des homozygotes et 79 % des hétérozygotes composites SC [14,16]. Elle débute par des phénomènes vaso-occlusifs en périphérie puis une néo-vascularisation se développe. Un fond d'œil annuel est préconisé. Le traitement repose sur la photo-coagulation au Laser argon des zones ischémiques [14].

- L'atteinte rénale : le spectre des atteintes rénales est large. Il s'agit principalement d'une glomérulopathie. Il peut exister également des tubulopathies avec des défauts de concentration et défauts d'acidification des urines. Dans l'étude d'Haymann *et al* d'une population d'adultes drépanocytaires homozygotes ayant 26 ans d'âge médian, 60 % présentaient une albuminurie [14,17]. Cette glomérulopathie évolue vers une insuffisance rénale chronique. La prévalence de celle-ci varie de 5 à 18 % selon les études [18]. Le dépistage d'une protéinurie et de la microalbuminurie doit donc être réalisé au moins une fois par an et en dehors de toute manifestation aiguë [14]. Un traitement par inhibiteur de l'enzyme de conversion est préconisé en cas de rapport albuminurie sur créatinurie supérieur à 30 mg/mmol [14].

- L'atteinte cardio-pulmonaire : en cas d'antécédent de syndromes thoraciques répétés, des plages de fibrose pulmonaire peuvent se développer, principalement dans les lobes inférieurs. Elles sont associées à un syndrome restrictif ou mixte [14,19]. Par ailleurs, comme dans les autres anémies hémolytiques, il existe des hypertensions artérielles pulmonaires (HTAP). Un cathétérisme droit doit être réalisé en cas de vitesse de régurgitation tricuspide supérieure à 2,8 m/s à l'échographie cardiaque. La prévalence de l'HTAP varie de 6 à 10,5 % selon les études [19,20]. En raison de l'hyper-débit (en rapport avec l'anémie chronique), il existe fréquemment une dysfonction ventriculaire gauche (dilatation puis hypertrophie excentrique) [20]. Il s'agit d'atteintes sévères ; les patients ayant à la fois une atteinte pulmonaire et une dysfonction diastolique ont un risque relatif de décès de 12 (IC 95 % : 3,8-38,1) [19].

## 4.2. Particularité des syndromes hétérozygotes composites

### 4.2.1. Les thalasso-drépanocytaires S $\beta$ 0

Ils ont globalement la même présentation biologique et clinique que les homozygotes (*cf tableau I*) [5].

### 4.2.2 Les hétérozygotes composites SC et S $\beta$ +

Ils ont une anémie et une réticulocytose moins marquées (10-12 g/dL *versus* 7-9 g/dL) que les SS (*cf tableau I*) [5]. Ils ont des présentations moins « bruyantes » et sont donc de découverte plus tardive, présentent moins de STA mais la létalité est possible, en lien avec l'hyperviscosité. La drépanocytose SC concerne un tiers des patients atteints d'un SDM en France. Il s'agit généralement de patients originaires des Caraïbes et d'Afrique de l'Ouest. Les patients sont moins symptomatiques que les SS. Les complications ophtalmologiques, ORL (hypoacousie, syndrome vestibulaire) et les ostéonécroses sont plus fréquentes que chez les patients SS. En revanche, les ulcères cutanés, l'HTAP, l'atteinte rénale, la vasculopathie cérébrale sont des complications plus rares [21]. La physiopathologie diffère de celle de la drépanocytose SS. Elle est liée en premier lieu à l'hyperviscosité. Ainsi, la pierre angulaire du traitement en cas de complication aiguë ou chronique consiste en des saignées.

**Tableau I. Caractéristiques biologiques des syndromes drépanocytaires majeurs [5, 6]**

|                                                  | Normale (N) | SS      | SC        | S $\beta$ <sup>0</sup> thal | S $\beta$ <sup>+</sup> thal |
|--------------------------------------------------|-------------|---------|-----------|-----------------------------|-----------------------------|
| Hb g/dL                                          | 12-16       | 7-9     | 10-12     | 7-9                         | 9-12                        |
| VGM fl                                           | 80-100      | N       | N         | 70-90                       | 70-90                       |
| Réticulocytes x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> | 50-100      | 200-600 | 100-200   | 200-400                     | 100-300                     |
| Electrophorèse de l'Hb %                         |             |         |           |                             |                             |
| A                                                | 97-98       | 0       | 0         | 0                           | 1-25                        |
| S                                                | 0           | 77-96   | 50 (C=50) | 80-90                       | 55-90                       |
| F                                                | <2          | 2-20    | <5        | 5-15                        | 5-15                        |
| A2                                               | 2-3         | 2-3     | -         | 4-6                         | 4-6                         |

Hémoglobine : Hb, VGM : volume globulaire moyen

## 5. Trait drépanocytaire

Les patients porteurs du trait drépanocytaire (hétérozygotes AS, porteurs sains AS) ne nécessitent pas de suivi médical mais doivent bénéficier d'un conseil génétique. Il est à noter que le terme drépanocytaire hétérozygote également utilisé devrait être évité afin que les personnes concernées ne confondent pas leur état avec la drépanocytose.

L'hétérozygotie AS n'entraîne pas d'anomalie de la numération formule sanguine, du frottis sanguin et du bilan martial. Le diagnostic est fait sur l'étude de l'hémoglobine<sup>(1)</sup> [6,11]. En règle générale, les hétérozygotes AS sont asymptomatiques. Il peut néanmoins survenir des infarctus spléniques en cas de séjour en altitude et des nécroses papillaires. Des publications rapportent la survenue exceptionnelle de rhabdomyolyses, morts subites en cas d'exercices physiques extrêmes dont la physiopathologie est mal comprise [5,14]. Aucun suivi n'est recommandé ; il convient avant tout de rassurer les patients. Néanmoins, il est impératif de leur expliquer le risque génétique lié au fait d'être porteur d'un gène  $\beta$ S et d'insister sur la nécessité de faire dépister le conjoint en cas de projet de procréation. Enfin, quelques conseils doivent être prodigués : éviter les séjours au delà de 3 000 mètres d'altitude et la plongée en apnée, interrompre tout effort violent et prolongé en cas de malaise ou de douleurs [5,14].

## 6. Manifestations biologiques

L'anémie est très fréquente, variable, rarement absente. En cas de CVO, il existe généralement une diminution de la concentration d'hémoglobine habituelle (ne dépassant pas 1-2 g/dL par rapport au chiffre habituel du patient), une augmentation de l'activité de la LDH (si elle est supérieure à 4N ou > 1 000 UI/L, c'est un marqueur de gravité) et des marqueurs d'hémolyse (augmentation de la bilirubine libre, de l'ASAT, des réticulocytes, apparition de l'hémoglobine libre dans le plasma). La concentration en haptoglobine est quasi nulle chez le patient drépanocytaire homozygote en crise comme en phase stationnaire [11,22]. Il peut exister une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles (pouvant dépasser 15 000/mm<sup>3</sup>), une augmentation de la CRP, de la PCT (en dehors de toute infection) ainsi qu'une augmentation d'autres marqueurs inflammatoires [5,13]. La CPK peut être modérément augmentée [11]. Il existe une tendance à l'hyponatrémie en crise et c'est un facteur pronostic d'évolution défavorable de la CVO [23].

Dans les crises prolongées, on peut observer une majoration transitoire de la thrombocytose (qui peut être supérieure à 1.10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>) [12].

De nombreuses modifications de l'hémostase sont présentes (diminution des protéines S et C inhibitrices de la coagulation, augmentation du facteur von Willebrand) qui aboutissent à un état d'hypercoagulabilité biologique [6,11]. Les D dimères sont constamment élevés et par conséquent n'ont pas de valeur prédictive d'une thrombose chez les malades drépanocytaires.

La polynucléose neutrophile (entre 15 000 et 20 000/mm<sup>3</sup>) et la tendance à la thrombocytose existent en dehors

des événements aigus [5]. La thrombocytose est liée à la régénération médullaire et à l'asplénie [11]. Chez les SC, il peut exister une thrombopénie (que l'on rapporte à la splénomégalie présente chez un tiers des patients SC) [14].

## 7. Traitement

Le respect des règles hygiéno-diététiques et la prévention des complications ont une grande importance dans le suivi des patients drépanocytaires.

### 7.1. Traitement de la crise vaso-occlusive et du syndrome thoracique

Le traitement repose en premier lieu sur le contrôle de la douleur. Le patient recevra de la morphine intraveineuse, en titration puis en analgésie autocontrôlée. Il est également nécessaire que le patient bénéficie d'une bonne hydratation avec alcalinisation (eau de Vichy), d'une oxygénothérapie, d'une kinésithérapie respiratoire incitative en prévention du STA. La supplémentation en acide folique doit être poursuivie. L'anxiété doit être prise en compte (prescription d'hydroxyzine, en effet les benzodiazépines sont à éviter car elles augmentent l'effet dépressur respiratoire de la morphine). En cas de STA fébrile, une antibiothérapie est débutée ; en cas de STA avec critère de gravité une transfusion est réalisée [14].

### 7.2. L'hydroxyurée (HU) ou hydroxycarbamide

C'est, avec les programmes transfusionnels, le seul traitement de fond, validé, de la drépanocytose. L'HU a fait la preuve de son efficacité en réduisant le nombre des CVO, des STA, des transfusions et ainsi la mortalité [24,25]. Si on ne dispose pas encore de preuves formelles de l'efficacité de l'HU sur les complications chroniques de la drépanocytose, des études de cohortes semblent tout de même suggérer un bénéfice sur les complications rénales, cardiaques...

Son mode d'action n'est pas totalement connu, mais ses effets bénéfiques sont multiples : augmentation de l'HbF qui diminue la polymérisation de l'HbS, diminution du nombre des leucocytes circulants et des réticulocytes, diminution des molécules d'adhésion, meilleure déformabilité des globules rouges grâce à une augmentation du volume de ceux-ci, augmentation de la vasodilatation grâce à l'induction du NO. Toutes ces propriétés aboutissent à une diminution de la vaso-occlusion [26]. Les principales indications sont la survenue de plus de 3 hospitalisations pour CVO en l'espace d'un an ou la survenue d'un STA grave ou la récurrence de STA. Les indications tendent à s'étendre : crises ambulatoires répétées, anémie chronique profonde, certaines complications chroniques... Le traitement est bien toléré. Les principaux effets indésirables sont la survenue de cytopénies, d'une hyperpigmentation des phanères, d'une diminution de la spermatogénèse (réversible à l'arrêt du traitement). La conservation du sperme doit être proposée avant de débuter le traitement. Il n'a pour le moment pas été observé d'augmentation de l'incidence des pathologies malignes après 30 ans de recul. Par mesure de précaution, le traitement doit être suspendu pendant la grossesse et l'allaitement [14,26-28]. Par ailleurs, il faut savoir que sous HU, le VGM et la TCMH vont augmenter de 30 %, l'Hb F va s'élever [11,14].

1. cf article 2, Nathalie Mario.

### 7.3. Transfusion et échanges transfusionnels

L'objectif de la transfusion est de diminuer la proportion de GR drépanocytaires par un apport de GR de donneurs. Les transfusions sont réalisées selon plusieurs modalités :

- transfusion ponctuelle en cas d'aggravation de l'anémie si elle est mal tolérée et/ou non régénérative, par exemple lors d'une érythroblastopénie à parvovirus B19, d'une complication aiguë grave (accident vasculaire cérébral, STA sévère, défaillance multi-viscérale...) et en prévention de la survenue d'événements vaso-occlusifs dans certaines chirurgies « lourdes » (transplantation, neurochirurgie, intervention avec garrot...) [14,27].

- programme transfusionnel : le patient bénéficie alors de transfusions toutes les 3 à 6 semaines. L'indication consensuelle en France et aux États-Unis est la vasculopathie cérébrale. L'objectif est alors de maintenir l'HbS en dessous de 30 % [14,27].

- afin d'éviter les complications de l'hyperviscosité (CVO, thromboses veineuses, troubles neurosensoriels), l'hématocrite post-transfusionnel doit rester inférieur à 33 %. Les patients bénéficieront donc soit de transfusions « simples » en cas de concentration initiale en hémoglobine inférieure à 7-8 g/dL, soit de « saignée transfusion » (ou échange transfusionnel ou exsanguino-transfusion) en cas de concentration supérieure. Cet échange transfusionnel peut être manuel ou automatisé (érythraphérèse) [14].

Actuellement, les 2 complications majeures de la transfusion sont :

- l'hémolyse post-transfusionnelle retardée : il s'agit d'un accident grave pouvant menacer le pronostic vital. La physiopathologie est complexe et incomplètement élucidée. Elle est due le plus souvent à une allo-immunisation anti-érythrocytaire conséquence du polymorphisme entre les groupes sanguins des donneurs d'origine caucasienne et receveurs d'origine afro-antillaise. Elle survient 5 à 28 jours après une transfusion et peut se manifester par l'apparition d'une CVO, d'un mauvais rendement transfusionnel (un culot doit augmenter de 6 à 12 % l'HbA et diminuer dans les mêmes proportions l'HbS) avec aggravation de l'anémie et disparition anormalement rapide de l'HbA apportée par les culots globulaires. Une réticulopénie peut être observée. En cas de suspicion d'accident d'hémolyse post-transfusionnelle retardée, il faudra faire une recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) et d'anticorps anti-HLA, un test de Coombs direct, un test d'élution érythrocytaire.

La prévention repose sur la limitation des indications de transfusion, la recherche d'antécédent d'hémolyse post-transfusionnelle et d'antériorité de RAI positives chez tout patient drépanocytaire. Les patients drépanocytaires doivent être transfusés avec des concentrés érythrocytaires phénotypés Rhésus Kell et comptabilisés [14,27].

- l'hémochromatose post-transfusionnelle : la surcharge survient à partir de 20 culots. Un traitement chélateur doit alors être envisagé. Un dosage régulier de la ferritine et du coefficient de saturation doit être réalisé à distance des CVO et des transfusions. Cependant la ferritinémie n'étant pas toujours bien corrélée à la surcharge ferrique histologique, une IRM hépatique avec séquence T2\* est à réaliser chez

les patients polytransfusés. Les saignées, quand elles sont possibles, permettent de limiter la surcharge en fer [7,14,27].

### 7.4. Allogreffe de moelle et thérapie génique

Il s'agit des seuls traitements curatifs de cette maladie.

#### 7.4.1. L'allogreffe de moelle

Les indications consensuelles se limitent actuellement aux enfants et à quelques patients adultes présentant une forme grave (vasculopathie cérébrale, échec d'un traitement par hydroxyurée bien conduit) et ayant un donneur HLA compatible [7,29]. En effet, ce traitement a une morbi-mortalité non négligeable (3 à 10 % de mortalité selon les études) mais en diminution. La recherche de modalités moins agressives de greffe progresse. Les indications ne sont pas encore très claires [29,30].

#### 7.4.2. La thérapie génique : une relève de la recherche

Des essais ont débuté chez l'homme en France et aux États-Unis. Le gène  $\beta$ -globine thérapeutique est transfecté dans les cellules souches hématopoïétiques du patient grâce à un lentivirus et lui sont réinjectées après correction (autogreffe) [29].

### 7.5 Autres traitements à l'étude

La progression de la compréhension de la physiopathologie de la drépanocytose permet d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques. De nombreuses molécules sont à l'étude chez l'homme et chez l'animal [29] : des agents diminuant la polymérisation de l'HbS en augmentant l'HbF (décitabine, pomalidomide) ou en augmentant l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, diminuant l'adhésion des drépanocytes à l'endothélium *via* le blocage des P-sélectines, des E-sélectines ou du VLA-4 (natalizumab), *via* la diminution de VCAM-1 (montelukast), de Lu/BCAM (propanolol) diminuant l'activation plaquettaire (Prasugrel, Apixaban), l'inflammation ou le stress oxydant sont à l'étude.

## 8. Conclusion

Cette maladie revêt un intérêt particulier pour les différents acteurs de santé et tout particulièrement pour le biologiste en raison de sa fréquence. En effet, si elle reste encore une maladie rare, il s'agit de la 1<sup>re</sup> maladie génétique dans le monde. Par ailleurs du fait de l'amélioration des soins et des flux migratoires, le nombre des malades est en constante augmentation dans notre pays. Enfin, si elle a bénéficié ces dernières décennies de grand progrès dans sa gestion (meilleure prévention des complications aiguës, et infectieuses et avènement d'un traitement de fond efficace et bien toléré, l'hydroxyurée) elle reste une maladie grave par ses complications aiguës et chroniques de survenue imprévisible et qui peuvent menacer le pronostic vital. Le biologiste peut être sollicité à toutes les étapes de cette maladie : diagnostic, dépistage néonatal, suivi du traitement.

**Conflits d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

## Références

- [1] Bartolucci P. Hemoglobin disorders: an advantage against malaria, but the risk of severe disease. *Rev Prat* 2014;64:1110-1.
- [2] Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO, Kariuki S, et al. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet Lond Engl* 2002;359:1311-2. doi:10.1016/S0140-6736(02)08273-9.
- [3] Aguilar Martinez P, Angastiniotis M, Eleftheriou A, Gulbis B, Mañú Pereira MDM, Petrova-Benedict R, et al. Haemoglobinopathies in Europe: health & migration policy perspectives. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:97. doi:10.1186/1750-1172-9-97.
- [4] Chakravorty S, Williams TN. Sickle cell disease: a neglected chronic disease of increasing global health importance. *Arch Dis Child* 2015;100:48-53. doi:10.1136/archdischild-2013-303773.
- [5] Lionnet F, Stankovic K, Girot R. Drépanocytose de l'adulte. *EMC - Hématologie* 2009;4:1-19. doi:10.1016/S1155-1984(09)49949-7.
- [6] Arnal C, Girot R. Drépanocytose chez l'adulte. *EM-Consulte* 2002. <http://www.em-consulte.com/article/12814/drepanocytose-chez-l-adulte> (accessed November 15, 2015).
- [7] Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet Lond Engl* 2010;376:2018-31. doi:10.1016/S0140-6736(10)61029-X.
- [8] BEH n° 27-28/2012 / 2012 / Archives / BEH - Bulletin épidémiologique hebdomadaire / Publications et outils / Accueil n.d. <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/BEH-Bulletin-epidemiologique-hebdomadaire/Archives/2012/BEH-n-27-28-2012> (accessed November 15, 2015).
- [9] Gomes E. BEH 8-10 mars 2015, Mortalité liée à la drépanocytose en France (1979-2010) n.d. [http://www.invs.sante.fr/beh/2015/8/2015\\_8\\_2.html](http://www.invs.sante.fr/beh/2015/8/2015_8_2.html) (accessed November 15, 2015).
- [10] Elion J, Laurance S, Lapoumèroulie C. [Pathophysiology of sickle cell disease]. *Médecine Trop Rev Corps Santé Colon* 2010;70:454-8.
- [11] Bachir D. La drépanocytose. *Rev Fr Lab* 2000;2000:29-35. doi:10.1016/S0338-9898(00)80307-8.
- [12] Ballas SK, Gupta K, Adams-Graves P. Sickle cell pain: a critical reappraisal. *Blood* 2012;120:3647-56. doi:10.1182/blood-2012-04-383430.
- [13] Gellen-Dautremier J, Brousse V, Arlet J-B. [Management of acute complications in sickle cell disease]. *Rev Prat* 2014;64:1114-9.
- [14] Habibi A, Arlet J-B, Stankovic K, Gellen-Dautremier J, Ribeil J-A, Bartolucci P, et al. [French guidelines for the management of adult sickle cell disease: 2015 update]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne* 2015;36:5S3-84. doi:10.1016/S0248-8663(15)60002-9.
- [15] Strouse JJ, Lanzkron S, Urrutia V. The epidemiology, evaluation and treatment of stroke in adults with sickle cell disease. *Expert Rev Hematol* 2011;4:597-606. doi:10.1586/ehm.11.61.
- [16] Leveziel N, Bastuji-Garin S, Lalloum F, Querques G, Benlian P, Binaghi M, et al. Clinical and laboratory factors associated with the severity of proliferative sickle cell retinopathy in patients with sickle cell hemoglobin C (SC) and homozygous sickle cell (SS) disease. *Medicine (Baltimore)* 2011;90:372-8. doi:10.1097/MD.0b013e3182364cba.
- [17] Haymann J-P, Stankovic K, Levy P, Avellino V, Tharaux P-L, Letavernier E, et al. Glomerular hyperfiltration in adult sickle cell anemia: a frequent hemolysis associated feature. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 2010;5:756-61. doi:10.2215/CJN.08511109.
- [18] Cazenave M, Koehl B, Nochy D, Tharaux P-L, Audard V. Spectrum of renal manifestations in sickle cell disease. *Néphrologie Thérapeutique* 2014;10:10-6. doi:10.1016/j.nephro.2013.07.366.
- [19] Miller AC, Gladwin MT. Pulmonary complications of sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:1154-65. doi:10.1164/rccm.201111-2082CI.
- [20] Gladwin MT, Sachdev V. Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:1123-33. doi:10.1016/j.jacc.2011.10.900.
- [21] Lionnet F, Hammoudi N, Stojanovic KS, Avellino V, Grateau G, Girot R, et al. Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases. *Haematologica* 2012;97:1136-41. doi:10.3324/haematol.2011.055202.
- [22] Stankovic Stojanovic K, Steichen O, Lefevre G, Bachmeyer C, Avellino V, Grateau G, et al. High lactate dehydrogenase levels at admission for painful vaso-occlusive crisis is associated with severe outcome in adult SCD patients. *Clin Biochem* 2012;45:1578-82. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.07.114.
- [23] Rech J-S, Lionnet F, Brault D, Orlando J, Steichen O. Valeur pronostique de l'hyponatrémie chez les drépanocytaires hospitalisés pour une crise vaso-occlusive aiguë. *Rev Médecine Interne* 2014;35:A61-2. doi:10.1016/j.revmed.2014.03.070.
- [24] Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* 1995;332:1317-22. doi:10.1056/NEJM199505183322001.
- [25] Voskaridou E, Christoulas D, Bilalis A, Plata E, Varvagiannis K, Stamatopoulos G, et al. The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). *Blood* 2010;115:2354-63. doi:10.1182/blood-2009-05-221333.
- [26] Yawn BP, Buchanan GR, Afenyi-Annan AN, Ballas SK, Hassell KL, James AH, et al. Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. *JAMA* 2014;312:1033-48. doi:10.1001/jama.2014.10517.
- [27] Evidence-Based Management of Sickle Cell Disease: Expert Panel Report, 2014 - NHLBI, NIH n.d. <https://www.nhlbi.nih.gov/health-pro/guidelines/sickle-cell-disease-guidelines> (accessed November 15, 2015).
- [28] de Montalembert M. [Hydroxyurea treatment in patients affected with sickle cell anemia: efficacy and safety]. *Transfus Clin Biol J Société Fr Transfus Sang* 2008;15:34-8. doi:10.1016/j.traccli.2008.03.010.
- [29] Archer N, Galacteros F, Brugnara C. 2015 Clinical trials update in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 2015;90:934-50. doi:10.1002/ajh.24116.
- [30] Bolaños-Meade J, Brodsky RA. Blood and marrow transplantation for sickle cell disease: is less more? *Blood Rev* 2014;28:243-8. doi:10.1016/j.blre.2014.08.001.



# Les thalassémies en 2016

Nathalie Bonello-Palot<sup>a</sup>, Mathieu Cerino<sup>a</sup>, Philippe Joly<sup>b</sup> et Catherine Badens<sup>a</sup>

## RÉSUMÉ

Les thalassémies sont des hémoglobinopathies de transmission autosomique récessive caractérisées par des anémies microcytaires et hypochromes de sévérité variable. Les thalassémies sont dites intermédiaires ou majeures avec entre ces deux formes un continuum de sévérité dépendant de différents facteurs d'origine génétique.

Cette revue décrit la situation de la thalassémie en France en 2016, la prise en charge, le diagnostic et les mesures spécifiques qui ont été mises en place dans le cadre des plans nationaux Maladies Rares. Des données cliniques et biologiques concernant les patients thalassémiques en France sont collectées dans un registre national, ce qui permet une harmonisation et une optimisation du suivi clinique. L'amélioration des modalités du traitement conventionnel ainsi que la perspective de nouveaux traitements comme la thérapie génique actuellement à l'essai, contribuent de façon sensible à l'amélioration globale de la prise en charge de cette pathologie rare en France.

**Alpha-thalassémies – bêta-thalassémies – hémoglobine.**

## SUMMARY

### Thalassemia in 2016

Thalassemia are hemoglobinopathies with recessive autosomal inheritance characterized by microcytic and hypochromic anemia of variable severity. Thalassemia are classified into intermediate or major forms according to anemia severity with a continuum of severity between the types depending on different genetics factors. This review describes the Thalassemia in France on 2016, the clinical follow up, diagnostic and specific measures settled in the context of the national plans for rare diseases. Clinical and biological data concerning Thalassemia patients in France are collected in a national register which allows a harmonization and an optimization of clinical monitoring. The improvement of conventional treatments and the perspective of innovative therapies such as gene therapy contribute to the global improvement in the monitoring of this rare disease in France.

**alpha-thalassemias – beta-thalassemias – hemoglobin.**

## 1. Introduction

Les thalassémies sont des maladies génétiques rares dont la fréquence varie beaucoup en Europe. Très présentes en Italie et en Grèce, elles sont très rares en Europe du Nord et en France en particulier, où l'incidence est de 1 sur 100 000 naissances. Grâce aux plans nationaux maladies rares et à la mise en place de centres de référence et de registres, les connaissances sur la répartition des patients thalassémiques sur le territoire français, leurs modalités de prise en charge et leur état de santé ont considérablement progressé ces dernières années. Nous présentons ici une mise au point sur ces pathologies en France, en 2016.

### **a** Département de Génétique Médicale

Laboratoire de Génétique Moléculaire

Centre de référence Thalassémies

APHM, Hôpital d'enfants de la Timone - 13385 Marseille cedex 5  
Aix-Marseille Université Inserm UMR\_S910: Génétique Médicale et  
Génomique Fonctionnelle - Faculté de Médecine, Marseille

### **b** Unité de Pathologie Moléculaire du Globule Rouge

Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire

Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon;

Centre de Recherche et d'Innovation sur le Sport (CRIS) – EA 647

Université Claude-Bernard Lyon 1, Villeurbanne; Labex GR-Ex,

Paris – Institut Universitaire de France.

\*Correspondance:

Catherine.BADENS@ap-hm.fr

## 2. Thalassémie majeure et thalassémie intermédiaire

Les thalassémies résultent d'une diminution de la production d'une des 2 chaînes protéiques constituant l'hémoglobine. Dans les conditions physiologiques, ces deux chaînes, l'alpha ( $\alpha$ ) et la bêta ( $\beta$ )-globine, sont synthétisées en proportions égales; elles fixent chacune une molécule d'hème et s'associent entre elles pour former un tétramère  $\alpha_2\beta_2$ . Si l'une des deux chaînes fait défaut, il apparaît d'une part une anémie plus ou moins profonde et d'autre part des anomalies de toute la lignée érythroïde désignées par le terme de dysérythropoïèse. L'anémie est liée directement au déficit quantitatif d'une des 2 chaînes de globine qui limite ou empêche la formation du tétramère alors que la dysérythropoïèse est provoquée par la chaîne non déficiente. Cette dernière, privée de son partenaire, précipite dans l'érythroblaste et dans le globule rouge et entraîne leur destruction [1]. On parle d'alpha-thalassémie si la chaîne  $\alpha$ -globine est déficiente et de bêta-thalassémie si c'est la chaîne  $\beta$ -globine. La sévérité du tableau clinique varie en fonction de l'importance du déficit: un déficit total par absence de l'une des chaînes entraîne une anémie létale et constitue la forme la plus sévère appelée Thalassémie Majeure. Un déficit partiel produit une anémie modérée qui peut être relativement bien tolérée et représente une forme atténuée de la maladie appelée Thalassémie Intermédiaire.

article reçu le 10 janvier, accepté le 20 janvier 2016

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

## 2.1. Aspects cliniques

### Les thalassémies majeures

Le tableau clinique typique de la bêta-thalassémie avec splénomégalie importante et déformations osseuses (maladie de Cooley) n'est plus observé de nos jours du fait de la prise en charge précoce par des transfusions régulières. Le diagnostic clinique se fait le plus souvent entre 6 et 24 mois devant une anémie sévère, associée à une hépatosplénomégalie et un ictère. En l'absence de transfusion, l'espérance de vie est inférieure à 20 ans.

En France et dans les pays occidentaux, les enfants bénéficient d'un programme transfusionnel systématique, régulier, débuté entre 1 et 4 ans le plus souvent et poursuivi tout au long de la vie, ce qui permet une croissance normale. Néanmoins, l'instauration d'un traitement chélateur du fer après quelques mois ou années de transfusions s'avère indispensable pour éviter une hémochromatose secondaire majeure. Le tableau d'alpha-thalassémie majeure est identique si ce n'est que l'anémie débute en période néo-natale car la chaîne  $\alpha$ -globine entre dans la composition de l'hémoglobine fœtale. Le décès survient en général in utero ou en période néonatale dans un tableau d'hydrops fœtal. Dans quelques rares cas où le diagnostic est réalisé précocement, les enfants sont transfusés *in utero* puis dès leur naissance et ont alors un développement comparable aux bêta-thalassémiques majeurs. On décrit toutefois chez ces patients une fréquence élevée de séquelles neurologiques irréversibles de l'anémie fœtale.

### Les formes intermédiaires

À côté des formes majeures qui sont des formes transfuso-dépendantes, on décrit les formes intermédiaires de thalassémie dont la sévérité peut être très variable mais qui ne sont pas dépendantes des transfusions ou seulement pendant certaines périodes de la vie. Il faut cependant noter que certains patients bêta-thalassémiques intermédiaires pendant leur enfance et leur adolescence peuvent évoluer vers une transfuso-dépendance totale avec l'âge. Dans ces formes atténuées, l'anémie sera plus ou moins bien tolérée. La surcharge en fer est également une complication même en l'absence de transfusion, puisque l'anémie chronique entraîne une augmentation de l'absorption intestinale du fer.

## 2.2. Profils biologiques :

Dans ce chapitre sont passés en revue les différents profils biologiques que l'on peut rencontrer ainsi que les techniques biochimiques utilisées pour l'étude de l'hémoglobine et les explorations moléculaires à indiquer.

Le bilan standard de l'hémoglobine (Hb) est basé sur la mise en œuvre d'une technique séparative permettant la séparation des différentes fractions de l'Hb et une quantification fiable des fractions d'hémoglobine A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) et d'hémoglobine fœtale (HbF) [2]. La technique mise en œuvre est soit une chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) par échange de cations soit une électrophorèse capillaire [3] [4].

L'interprétation des résultats de l'étude de l'hémoglobine doit être accompagnée idéalement des examens et des informations suivantes :

- Les résultats de la numération sanguine (avec indices érythrocytaires) :
- nombre de globules rouges (GR) ;

- taux d'hémoglobine (Hb) ;
- volume globulaire moyen (VGM) ;
- teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) ;
- indice de répartition des globules rouges (RDW).

- Le bilan martial ou au moins la ferritinémie associée à la CRP pour écarter toute inflammation affectant la ferritinémie ;
- L'information concernant d'éventuelles transfusions récentes (< 3 mois, durée correspondant à la demi-vie du globule rouge), d'un traitement par un inducteur de l'HbF (érythropoïétine ou hydroxy-urée) ou d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Nous présentons ci-après les principaux profils chromatographiques évocateurs de thalassémie pouvant être rencontrés en laboratoire d'analyse. Les illustrations représentent des chromatogrammes obtenus principalement en CLHP et en électrophorèse capillaire.

### 2.2.1. Profil d'un patient thalassémique majeur

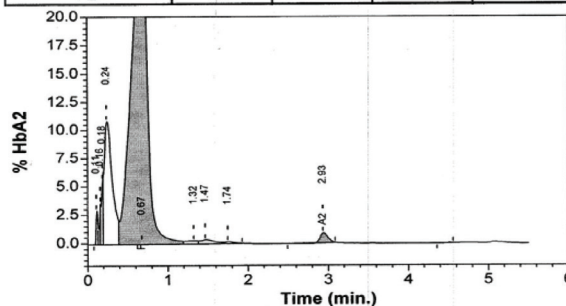
Une thalassémie majeure doit être évoquée en l'absence d'hémoglobine A. Elle est associée à une anémie sévère microcytaire et hypochrome.

En cas d'alpha-thalassémie, il n'y aura ni HbA, ni HbF, ni HbA<sub>2</sub> puisque la chaîne alpha-globine entre dans la composition de ces 3 hémoglobines. Le diagnostic sera donc fait en période fœtale ou périnatale.

En cas de bêta-thalassémie, on aura une absence ou une forte réduction de la fraction d'HbA et la présence d'HbF (> 80 %) et d'HbA<sub>2</sub> à un taux anormalement élevé à l'âge adulte (**figure 1**).

Figure 1 – Profil chromatographique d'un patient bêta-thalassémique majeur.

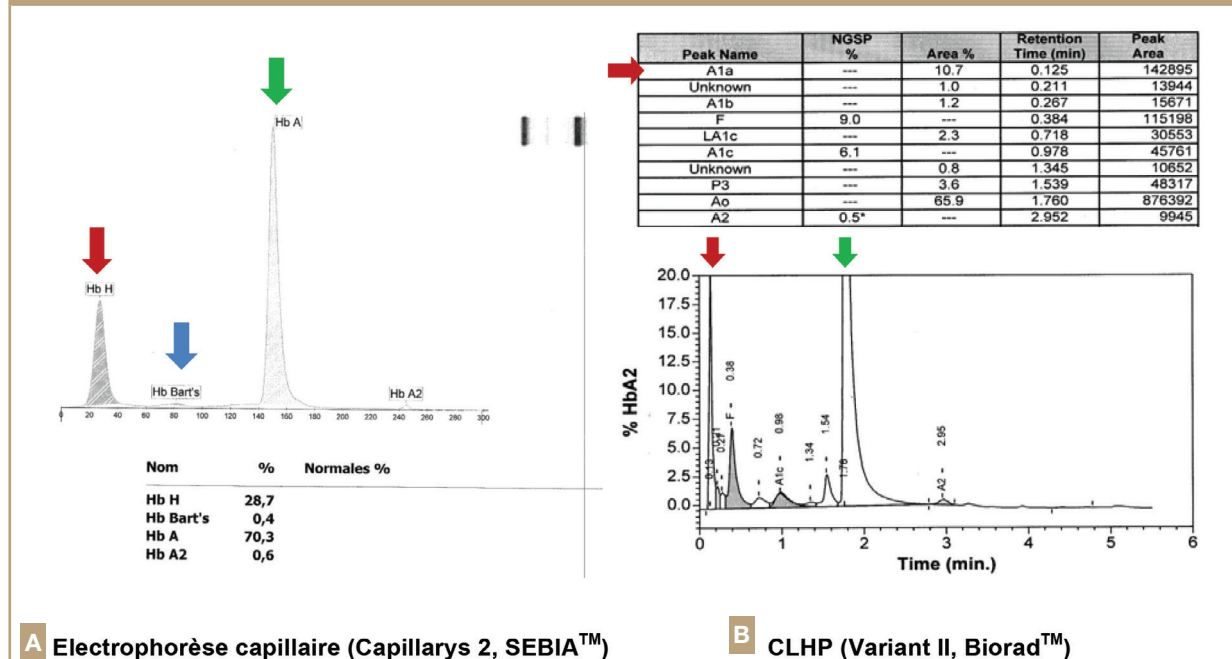
| Peak Name | NGSP % | Area % | Retention Time (min) | Peak Area |
|-----------|--------|--------|----------------------|-----------|
| Unknown   | ---    | 0.9    | 0.108                | 14014     |
| Unknown   | ---    | 0.9    | 0.158                | 13558     |
| Unknown   | ---    | 2.0    | 0.182                | 31403     |
| A1a       | ---    | 14.7   | 0.237                | 229785    |
| F         | 82.0   | ---    | 0.672                | 1218488   |
| Unknown   | ---    | 0.5    | 1.321                | 8260      |
| P3        | ---    | 0.8    | 1.466                | 12908     |
| Ao        | ---    | 0.3    | 1.744                | 4457      |
| A2        | 0.9*   | ---    | 2.932                | 17440     |



CLHP (Variant II, Biorad™)

Profil obtenu chez un enfant (le diagnostic étant généralement réalisé entre 6 et 24 mois). L'absence d'HbA due à l'absence de synthèse de chaînes  $\beta$  signe la présence d'une bêta-thalassémie majeure.

Figure 2 – Profils chromatographique et électrophorétique d'une HbH.



L'HbH (flèches rouges) signe la présence d'une alpha-thalassémie et apparaît quelques mois après la naissance.

**A.** Profil électrophorétique d'un patient présentant à la fois un pic d'HbH (flèche rouge) et un discret pic d'hémoglobine Bart's résiduelle (flèche bleue) associé à de l'HbA (flèche verte).

**B.** Profil chromatographique d'un patient présentant une hémoglobino H. L'HbH remplace progressivement l'hémoglobine Bart's qui se situe dans la même fenêtre de migration (au début du chromatogramme).

À noter : un prélèvement hémolysé peut présenter un pic au niveau de l'HbH.

### 2.2.2. Profil d'un patient thalassémique intermédiaire

#### L'alpha-thalassémie ou hémoglobino H

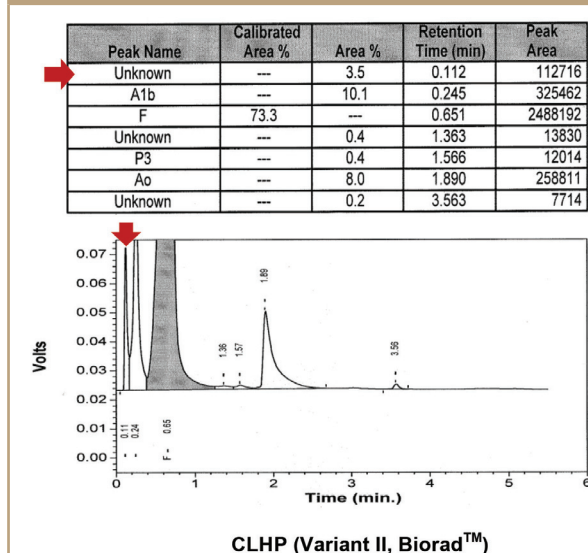
Les chaînes  $\beta$  libres en excès s'associent pour former de l'hémoglobine H ( $\beta_4$ ) détectable par les techniques biochimiques et représentant une fraction de 4 à 8 %. On parle d'alpha-thalassémie ou d'hémoglobino H (figure 2). Ces formes d'alpha-thalassémies intermédiaires peuvent être diagnostiquées dès la naissance mais également fortuitement pendant l'enfance ou à l'âge adulte. Il est important de pouvoir diagnostiquer ces formes notamment pour le conseil génétique. À la naissance, on peut retrouver de l'hémoglobine Bart's (figure 3) formée de 4 chaînes fœtales ( $\gamma_4$ ). La transition se fait rapidement après la naissance avec l'apparition de l'hémoglobine H ( $\beta_4$ ) et la disparition de l'Hb Bart's.

#### La bêta-thalassémie intermédiaire :

La fraction d'HbF est ici importante, voire majoritaire avec présence d'HbA et d'un taux anormalement élevé d'HbA2 entre 4 et 7 %. La numération sanguine montre une pseudo-polyglobulie associée à une anémie de sévérité variable, microcytaire et hypochrome.

### 2.2.3. Profil d'un trait thalassémique (porteur sain) et indices érythrocytaires

Le profil de porteur sain ou trait thalassémique, que ce soit alpha ou bêta, est toujours accompagné d'une pseudo-polyglobulie, d'une microcytose et d'une hypochromie, très marquées dans le cas d'un trait bêta-thalassémique et beaucoup plus modérées dans le cas d'une alpha-thalassémie.

Figure 3 – Profil chromatographique d'une hémoglobine Bart's ( $\gamma_4$ ).

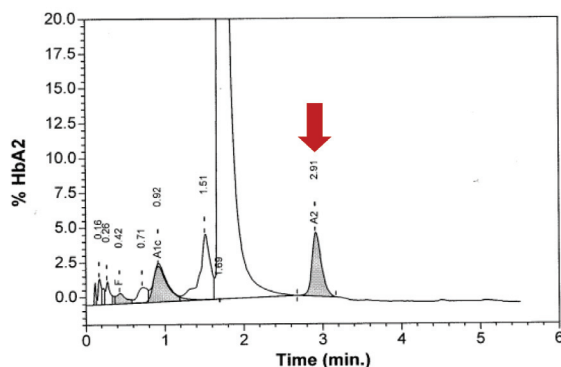
L'hémoglobine Bart's signe la présence d'une alpha-thalassémie à la naissance (flèches rouges). À noter qu'un prélèvement hémolysé peut entraîner ce type de pic en début de chromatogramme.

C'est pourquoi les données hématimétriques et le bilan martial doivent être disponibles pour l'interprétation des résultats de l'étude de l'Hb.

Le trait bêta-thalassémique est caractérisé par une augmentation de la fraction d'HbA2 qui sera supérieure à 3,2 %

**Figure 4 – Profil chromatographique de  $\beta$ -thalassémie hétérozygote.**

| Peak Name | NGSP % | Area % | Retention Time (min) | Peak Area |
|-----------|--------|--------|----------------------|-----------|
| A1a       | ---    | 0.6    | 0.163                | 17768     |
| A1b       | ---    | 0.7    | 0.262                | 20736     |
| F         | 0.8    | ---    | 0.425                | 19904     |
| LA1c      | ---    | 1.4    | 0.712                | 40988     |
| A1c       | 5.6    | ---    | 0.916                | 107049    |
| P3        | ---    | 5.1    | 1.506                | 152810    |
| Ao        | ---    | 83.8   | 1.692                | 2515096   |
| A2        | 4.6*   | ---    | 2.907                | 126983    |



CLHP (Variant II, Biorad™)

Présence d'un taux d'HbA2 élevé (cadre et flèche rouge) entre 3,5 et 7 %.

(sans dépasser 7 %) (figure 4 pour un profil typique et figure 5 pour un profil de bêta-thalassémie dite silencieuse). Le trait alpha-thalassémique est quant à lui, associé à un profil normal de l'Hb sauf en période néo-natale où des traces d'Hb Barts peuvent être observées avant de disparaître très rapidement. On évoque donc un profil de

trait alpha-thalassémique en cas de pseudopolyglobulie, microcytose et hypochromie associé à un bilan martial normal et un profil de l'Hb normal.

Le **tableau 1** résume les caractéristiques des principales formes de thalassémies.

## 2.2.4. Le porteur sain est-il tout à fait sain ?

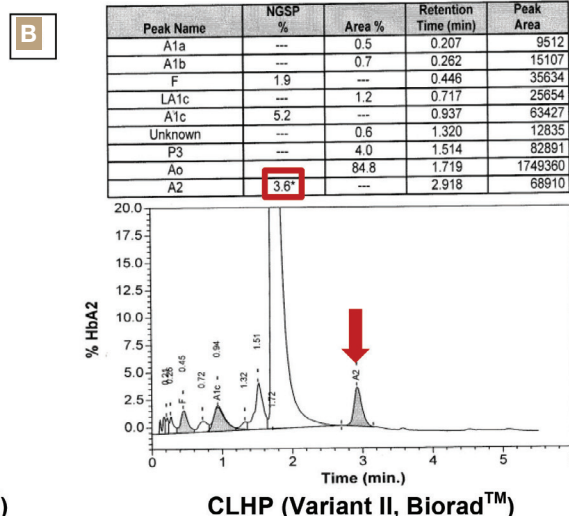
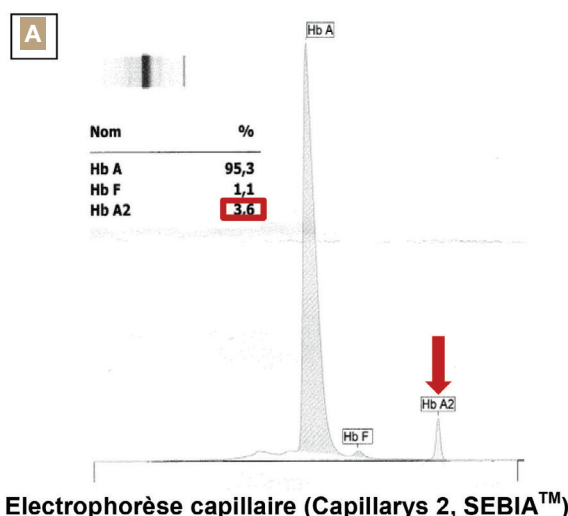
Il est généralement admis que le porteur sain (trait thalassémique) est asymptomatique. En effet, la présence de l'allèle thalassémique est compensée par l'allèle sain et il n'y a pas de signes cliniques associés. Néanmoins, il a été montré que la valeur moyenne de l'Hb totale est plus faible dans une population de porteur sain de thalassémie que dans une population témoin [5]. Par conséquent, dans certaines conditions physiologiques telle que la grossesse ou pathologiques comme l'insuffisance rénale, les sujets porteurs d'un trait thalassémique seront plus exposés à développer une anémie. Par ailleurs, il est décrit un nombre accru de complications thrombotiques chez les personnes porteuses de trait bêta-thalassémique et présentant d'autres facteurs de risque comme des variants du Facteur V Leiden [6].

L'enjeu principal du diagnostic de ces formes hétérozygotes est d'évaluer le risque de transmission de formes sévères ou intermédiaires aux générations suivantes afin de délivrer un conseil génétique approprié.

## 2.2.5. Limite de la détection par examen biochimique

L'approche biochimique du trait alpha-thalassémique reste avant tout un diagnostic d'exclusion qui présente certaines limites. Ceci est d'autant plus vrai que tous les examens complémentaires ne sont pas forcément disponibles (bilan martial en particulier) d'où l'importance de sensibiliser les cliniciens quant à la nécessité d'obtenir toutes les informations indispensables à l'interprétation

**Figure 5 – Profils chromatographique et électrophorétique de bêta-thalassémie hétérozygote silencieuse.**



Le taux d'HbA2 est discrètement augmenté (3,6 % cadre et flèches rouges) sur deux techniques différentes.

À gauche (A) par une électrophorèse capillaire (Capillarys 2, SEBIA™), à droite (B) par une CLHP Variant II, BIORAD™. Ceci correspond à une bêta-thalassémie hétérozygote, dite silencieuse car due probablement à une mutation du promoteur ou d'un site d'épissage du gène HBB.



Tableau I – Résumé des caractéristiques hématologiques et électrophorétiques des patients thalassémiques.

| Diagnostic (Génotype)                                                   | Données hématologiques                                                                                                            | Profil électrophorétique et/ou chromatographique                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alpha-thalassémie : porteur silencieux ( $\alpha\alpha / -\alpha$ )     | Bilan hématologique normal ou association d'une discrète microcytose (VGM < 80 fl) et/ou d'une discrète hypochromie (TCMH < 27pg) | Normal chez l'adulte:<br>Taux Hb A2 < 3.2%<br>Taux Hb F < 1%<br>A la naissance présence possible d'Hb Bart's ( $\approx 1$ à 4%) |
| Trait alpha-thalassémique ( $-\alpha / -\alpha$ ou $\alpha\alpha / -$ ) | - Discrète pseudo-polyglobulie (parfois absente)<br>- Microcytose<br>- Hypochromie                                                | Normal chez l'adulte:<br>Taux Hb A2 < 3.2%<br>Taux Hb F < 1%<br>A la naissance présence possible d'Hb Bart's ( $\approx 10\%$ )  |
| Alpha-thalassémie intermédiaire ( $\alpha- / -$ )                       | - Anémie régénérative d'intensité variable<br>- Microcytose<br>- Hypochromie                                                      | Présence à la naissance d'Hb Bart's ( $\approx 20\%$ à 40%)<br>Puis apparition précoce d'Hb H ( $\approx 5$ à 30%)               |
| Alpha-thalassémie majeure ( $- / -$ )                                   | Anémie sévère microcytaire et hypochrome en période fœtale                                                                        | Présence Hb Bart's (100%)<br>Absence d'Hb A<br>Absence d'Hb F                                                                    |
| Trait bêta-thalassémique ( $\beta/\beta^0$ ou $\beta/\beta^+$ )         | - Pseudo-polyglobulie franche (sauf pour les formes atténuées)<br>- Microcytose<br>- Hypochromie                                  | Taux Hb A2 > 3.2%<br>Taux Hb F normal à légèrement augmenté                                                                      |
| Bêta-thalassémie intermédiaire ( $\beta^0/\beta^+$ )                    | - Pseudo-polyglobulie<br>- Anémie régénérative d'intensité variable<br>- Microcytose<br>- Hypochromie                             | Faible taux d'Hb A<br>Taux (relatif) élevé d'Hb F<br>Taux d'Hb A2 > 3.2%                                                         |
| Bêta-thalassémie majeure ( $\beta^0/\beta^0$ )                          | Anémie sévère microcytaire et hypochrome associée à une érythroblastose importante                                                | Absence d'HbA<br>Taux (relatif) élevé d'Hb F<br>Taux d'Hb A2 > 3.2%                                                              |

du résultat par le biologiste.

Le problème des limites du diagnostic biochimique ne concerne pas les formes sévères qui sont relativement aisées à mettre en évidence. Le véritable enjeu pour le biologiste se situe surtout dans la capacité à repérer les porteurs sains afin d'évaluer les risques de transmission de formes sévères. Dans les cas où le profil biochimique ne permet pas de conclure avec certitude, on indiquera une recherche de mutation des gènes de globine en biologie moléculaire. Si deux membres d'un même couple sont porteurs de trait thalassémiques, le couple doit être orienté vers un centre de référence pour les maladies de l'hémoglobine ou vers un service de génétique pour une exploration moléculaire, que ce soit dans un cadre pré-conceptionnel ou prénatal, afin de bénéficier d'un conseil génétique adapté.

### 3. Bases génétiques, modulateurs génétiques de sévérité

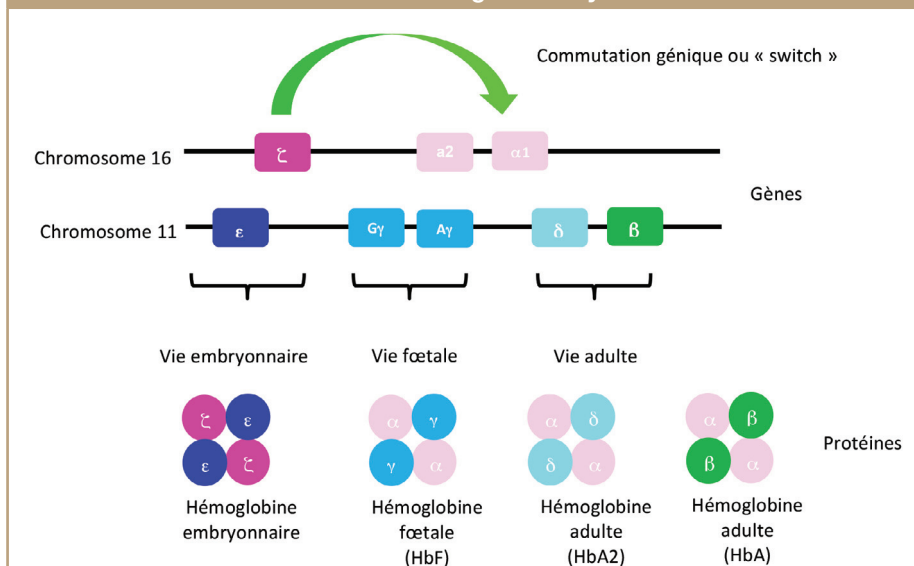
#### 3.1. Bases génétiques des thalassémies

Les thalassémies sont dues à un défaut moléculaire qui touche soit le locus  $\alpha$ -globine dans le cas des alpha-thalassémies soit le locus  $\beta$ -globine dans le cas des bêta-thalassémies. Ces deux locus alpha et bêta subissent au cours du développement respectivement une et deux commutations géniques ou

« switch » génique qui aboutissent à l'expression séquentielle de gènes localisés de 5' en 3', tour à tour exprimés puis réprimés [7] (figure 6).

Le locus alpha-globine est situé sur le chromosome 16. On parle de cluster de gènes car ce locus est composé de 3 gènes homologues, le gène zêta exprimé pendant la vie embryonnaire et les gènes alpha 1 (*HBA1*) et alpha 2 (*HBA2*) exprimés à partir de la vie fœtale. Un point important à souligner est la présence de deux gènes alpha (*HBA1* et *HBA2*) par chromosome et donc la présence de 4 gènes alpha fonctionnels chez chaque individu.

Figure 6 – Les différents gènes de globines et les différentes hémoglobines synthétisées.



Le locus  $\beta$ -globine est situé sur le chromosome 11. On parle également de cluster de gènes car ce locus est composé de 4 gènes : le gène epsilon exprimé pendant la vie embryonnaire puis les gènes  $G\gamma$  et  $A\gamma$  exprimés pendant la vie fœtale et enfin les gènes  $\delta$  et  $\beta$  exprimés pendant la vie adulte.

Les mutations responsables des thalassémies sont, pour la plupart, connues et rapportées dans une base de données nommée HbVar, accessible en ligne (<http://globin.cse.psu.edu/>).

## 3.2. Les alpha-thalassémies

### 3.2.1. Les anomalies moléculaires

Les alpha-thalassémies sont dues dans la majorité des cas à des délétions. On peut distinguer deux types de délétions : les délétions de type 1 qui entraînent la perte des 2 gènes *HBA1* et *HBA2* sur le même chromosome et sont donc responsables d'un trait  $\alpha$ 0-thalassémique ; les délétions de type 2 qui entraînent la perte de la région intergénique entre *HBA1* et *HBA2* et une partie de ces deux gènes aboutissant soit à un gène de fusion, comme la délétion  $\alpha$ -3.7kb, soit à la délétion d'un des deux gènes comme la délétion  $\alpha$ -4.2kb [8].

Ces anomalies moléculaires sont dues à la présence de grandes régions d'homologie encadrant les gènes *HBA1* et *HBA2* favorisant de ce fait des mésappariements. Certaines de ces délétions sont très fréquentes et suivent une répartition géographique particulière, les deux types de délétions se retrouvent chez les populations d'Asie du Sud-Est et l'Inde et également, pour le type 2, en Afrique et autour du bassin méditerranéen. Certaines délétions peuvent être très rares et parfois dites « privées », restreintes à une famille. À côté de ces délétions, il existe aussi des mutations ponctuelles dans les gènes alpha-globine. Elles sont plus fréquentes dans le gène *HBA2* et peuvent toucher les sites donneurs et accepteurs d'épissage, le signal de polyadénylation ou le codon stop.

### 3.2.2. Corrélation génotype-phénotype

Le phénotype des alpha-thalassémies est de sévérité proportionnelle au nombre de gènes altérés. Ainsi nous pouvons distinguer 4 cas :

- 1 gène altéré (3 gènes fonctionnels) : pas de modification du phénotype ni clinique ni biologique.
- 2 gènes altérés : indices érythrocytaires perturbés avec polyglobulie, microcytose et hypochromie. On parle alors de trait alpha-thalassémique (ou de thalassémie mineure).
- 3 gènes altérés ou Hémoglobinoses H (définie par l'association de 4 chaînes  $\beta$  de globine) alpha-thalassémie symptomatique avec présence d'une anémie en général bien tolérée entre 80 et 100 g/l. L'Hb H est une hémoglobine instable qui précipite dans l'hématie sous la forme de corps de Heinz visibles sur le frottis sanguin.
- 4 gènes altérés : absence totale de synthèse des chaînes  $\alpha$  de globine, anémie fœtale sévère entraînant la mort *in utero* ou en période périnatale dans un tableau clinique d'anasarque fœto-placentaire. Dans ce contexte, la transfusion est la seule alternative thérapeutique. On parle alors d'alpha-thalassémie majeure.

## 3.3. Les bêta-thalassémies

### 3.3.1. Les anomalies moléculaires

Les bêta-thalassémies sont dues dans la grande majorité des cas à des mutations ponctuelles. Ces mutations peuvent être responsables de :

- $\beta^0$ -thalassémie aboutissant à l'absence totale d'expression des chaînes  $\beta$ -globine
- $\beta^+$ -thalassémie responsable d'une diminution de l'expression des chaînes  $\beta$ -globine

### 3.3.2. Corrélation génotype-phénotype

Il faut distinguer ici les hétérozygotes des homozygotes ou hétérozygotes composites pour des mutations du gène *HBB*.

- Les patients porteurs d'une mutation hétérozygote dans le gène *HBB* sont des porteurs asymptomatiques qui présentent des indices érythrocytaires modifiés avec la présence d'une pseudo-polyglobulie, d'une microcytose et d'une hypochromie et à l'étude de l'hémoglobine, une fraction d'HbA2 > 3,2 %.
- Les patients porteurs d'une mutation homozygote ou de 2 mutations (hétérozygote composite) présentent une bêta-thalassémie de sévérité variable en fonction de la nature des mutations, pouvant aller d'une forme intermédiaire à une forme majeure. Il existe un continuum de sévérité entre le porteur sain et le patient bêta-thalassémique majeur en fonction d'une part, de la nature des mutations dans le gène *HBB* et d'autre part, d'un certain nombre de facteurs modificateurs que nous détaillerons dans le chapitre suivant.

### 3.3.3. Les techniques de biologie moléculaire

Il existe différentes techniques de biologie moléculaire pour mettre en évidence ces anomalies moléculaires.

- Le séquençage direct par Sanger permet de mettre en évidence toutes les mutations ponctuelles.
- La technique de reverse dot-blot (kits commerciaux) permet le diagnostic des thalassémies sur des bandelettes présentant des sondes portant les anomalies moléculaires les plus fréquentes pour :
  - les alpha-thalassémies
  - les bêta-thalassémies,
  - et plus récemment pour les facteurs dits « modulateurs de sévérité du phénotype ».

## 4. Les modulateurs génétiques de sévérité des bêta-thalassémies

La sévérité des bêta-thalassémies est influencée par différents facteurs.

### 4.1. Les facteurs influençant l'équilibre entre les chaînes $\alpha$ et $\beta$

- Le type de mutation dans le gène *HBB* : chez les homozygotes et hétérozygotes composites, le tableau clinique observé sera avant tout fonction de la combinaison de mutations observée.
- Une alpha-thalassémie associée : en effet, l'inactivation d'un ou plusieurs gènes  $\alpha$ -globine peut corriger le déséquilibre de synthèse des chaînes de globine en

normalisant le rapport  $\alpha/\beta$ . La sévérité de la thalassémie est proportionnelle au niveau de déséquilibre entre les chaînes de globine [9] [10].

## 4.2. Les facteurs génétiques influençant la synthèse d'hémoglobine fœtale à l'âge adulte

- Un facteur présent dans le locus  $\beta$ -globine :
  - une mutation dans le promoteur HBG2, couramment appelée polymorphisme Xmn1. Des études ont montré que ce polymorphisme est associé à un taux d'HbF plus élevé à l'âge adulte [11].
- Autres facteurs présents non liés au locus  $\beta$ -globine :
  - Des polymorphismes d'une région en 6q23 ont été associés à un taux d'HbF élevé [12] [13]. Dans cette région, se trouvent deux gènes, HBS1L et cMYB qui jouent un rôle au cours de l'érythropoïèse.
  - Une seconde région a été mise en évidence plus récemment, au locus 2p15, contenant le gène BCL11A [14]. Plusieurs études ont montré que des polymorphismes de ce gène sont liés à une augmentation du taux d'HbF chez des personnes d'origines géographiques différentes [15] [16]. Ce gène joue un rôle dans la régulation des gènes de globine et notamment dans la répression des gènes fœtaux à l'âge adulte [17].

## 5. Traitements

Les thalassémies majeures et intermédiaires sont considérées en France comme une affection de longue durée (ALD n° 10) et la Haute Autorité de Santé (HAS) met à disposition un Protocole National de Dépistage et de Soins (PNDS) rédigé par un groupe de spécialistes. Il s'agit d'un document opposable téléchargeable sur le site [www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr). Les alpha-thalassémies de type hémoglobinoses H sont en général bien tolérées et ne nécessitent pas de prise en charge particulière en dehors de la surveillance du taux d'hémoglobine. Les alpha-thalassémies majeures, extrêmement rares en France, sont au contraire le plus souvent létales en période périnatale. La description des traitements qui suit concerne donc majoritairement les bêta-thalassémies.

### 5.1. Transfusion et prise en charge de la surcharge en fer secondaire

Ce traitement constitue le traitement conventionnel. Dans les formes majeures de thalassémie, il a pour objectif de pallier à l'anémie par un régime transfusionnel systématique pour assurer une croissance staturo-pondérale et une vie normale tout en réduisant les manifestations de l'érythropoïèse inefficace. Le taux d'Hb est maintenu à un minimum de 90-100 g/L chez l'enfant et de 80-90 g/L chez l'adulte. Les transfusions sont associées à un traitement chélateur du fer adapté et débuté avant l'âge de 10 ans afin de prévenir au maximum la surcharge en fer secondaire et ses complications cardiaques, hépatiques et endocriniennes. Lorsque le traitement chélateur est bien observé, les complications cliniques de la surcharge en fer sont limitées et l'espérance de vie dépasse alors 40

ans. Toutefois, l'observance du traitement est un problème important, comme dans de nombreuses autres maladies chroniques. C'est d'autant plus le cas dans la Thalassémie majeure que la surcharge en fer s'installe très progressivement, que ses effets se développent à bas bruit et que les effets bénéfiques du traitement préventif sont des effets à long terme et sont donc difficiles à apprécier par le patient. La morbidité et la mortalité de la bêta-thalassémie sont majoritairement liées à la surcharge en fer post-transfusionnelle. Les complications cardiaques de la surcharge martiale représentent la cause de décès la plus fréquente (environ 71 %) des patients thalassémiques majeurs [18]. Dans les formes intermédiaires, l'intensité du traitement sera adaptée à la sévérité plus ou moins importante de l'anémie. L'objectif du traitement est le même que dans les formes majeures mais les moyens sont plus divers : splénectomie, inducteurs d'HbF (hydroxy-urée principalement), transfusions ponctuelles. La surcharge en fer doit également être prévenue même si le patient n'est pas transfusé car l'anémie chronique, en favorisant l'absorption intestinale du fer, prédispose à l'hémochromatose.

Le but du traitement chélateur est de maintenir des concentrations tissulaires en fer en deçà du seuil induisant des lésions cellulaires. Il est débuté après 10 à 20 transfusions ou lorsque la ferritinémie dépasse 1 000  $\mu\text{g/L}$ . Un suivi para-clinique objectif et régulier de la surcharge en fer au niveau du foie et du cœur est nécessaire pour adapter au mieux le traitement chélateur.

Le suivi régulier des ferritinémies (tous les 3 mois) est le paramètre biologique le plus utilisé en pratique courante. Schématiquement, des valeurs répétées supérieures à 2 500  $\mu\text{g/L}$  exposent fortement aux complications cardiaques.

Les techniques d'IRM hépatique ou cardiaque permettent de suivre de façon efficace et non-invasive la surcharge en fer de ces deux organes qui sont les cibles principales de l'hémochromatose secondaire. Ces examens sont réalisés très régulièrement chez les patients thalassémiques et permettent d'ajuster le traitement chélateur. Trois molécules différentes sont disponibles pour la chélation du fer, l'une administrée par voie sous-cutanée lente, la déféroxamine et les 2 autres par voie orale, le déférasirox et la défériprone. Ce traitement doit être administré pendant toute la vie du patient et conditionne sa survie sans complications d'organe. Des combinaisons de 2 molécules parmi les 3 peuvent être utilisées en cas de nécessité d'intensification du traitement [19].

### 5.2. Greffe de cellules souches hématopoïétiques

Une greffe de cellules souches hématopoïétiques est systématiquement proposée aux patients bêta-thalassémiques majeurs s'il existe un donneur intrafamilial HLA identique. C'est le seul traitement curatif à ce jour mais les complications immédiates sont graves et doivent être mises en balance avec l'efficacité du traitement palliatif classique. La greffe doit idéalement être proposée dans la petite enfance. La probabilité de survie sans maladie après greffe de moelle osseuse HLA-identique intrafamiliale varie de 49 à 94 % selon les études. Les résultats chez l'enfant sont excellents.

### 5.3. Traitements inducteurs de l'hémoglobine fœtale (HbF)

L'HbF, dont la synthèse est réprimée au stade adulte, est tout à fait capable de remplacer l'hémoglobine adulte. Trois classes de médicaments induisent une augmentation de l'HbF qui peut atténuer l'anémie :

- les agents cytotoxiques et/ou hypométhylants parmi lesquels on trouve l'hydroxy-urée (HU), la décitabine et la 5-azacytidine ;
- les dérivés des acides gras à chaîne courte avec un effet inhibiteur des histones désacétylases (HDAC). Les principales molécules de cette classe sont le phénylbutyrate de sodium, le butyrate d'arginine et l'isobutyrate ;
- l'érythropoïétine recombinante.

À ce jour, seule l'HU (Siklos®) a obtenu une AMM dans l'indication de la thalassémie et est à présent utilisée assez largement dans les formes intermédiaires de la maladie avec une efficacité chez environ 50 % des patients. Les principales indications de la mise sous HU sont l'anémie sévère et/ou les tumeurs hématopoïétiques extra-médullaires (prolifération ectopique de tissu hématopoïétique) [20].

### 5.4. Thérapie génique

La première tentative réussie de thérapie génique dans la bêta-thalassémie a été réalisée en 2007 chez un patient thalassémique transfusion dépendant [21]. Les cellules souches (CD34+) de ce patient ont été prélevées puis modifiées par un vecteur lentiviral contenant une version fonctionnelle du gène de la  $\beta$ -globine. Le patient est devenu transfuso-indépendant après quelques mois et aucun processus leucémique n'est apparu. Depuis ce succès, plusieurs autres patients ont été ainsi greffés et sont en cours d'évaluation.

## 6. Prévention

### 6.1. Le dépistage néonatal

La bêta-thalassémie majeure est facilement repérée à la naissance chez le nouveau-né par l'absence totale d'HbA et la présence exclusive d'HbF. Toutefois, il n'y a pas d'intérêt à dépister à la naissance la bêta-thalassémie car les enfants naissent en bonne santé, avec un taux d'HbF élevé qui ne commencera à chuter en général, qu'après les 6 premiers mois de vie. Il n'y a pas de mesures préventives et la prise en charge se fait à l'apparition de l'anémie. Le fait est qu'une autre maladie de l'hémoglobine, la drépanocytose, est dépistée dans le cadre du programme national de dépistage néonatal par l'étude de l'hémoglobine, car elle peut entraîner des complications mortelles chez l'enfant avant l'âge de 2 ans et qu'il existe des mesures préventives de ces complications. Les techniques d'analyse mises en œuvre pour dépister la drépanocytose permettent aussi d'identifier les enfants atteints de bêta-thalassémie majeure. Le résultat de ces découvertes fortuites est transmis aux parents pour faciliter le diagnostic au moment où la symptomatologie se met en place.

### 6.2. Le dépistage pré-conceptionnel

Les stratégies de dépistage et de prévention sont extrêmement variables d'un pays à l'autre en fonction de la

prévalence des thalassémies dans la région considérée. Schématiquement, dans les pays d'Europe du Sud et du Moyen-Orient où la maladie est fréquente, le public et les médecins généralistes sont bien informés sur la maladie et un dépistage systématique des hétérozygotes est le plus souvent organisé en routine, soit en période scolaire (Italie), soit en période prémaritale (Chypre, Turquie, Iran), soit en début de grossesse. Cette dernière option paraît la plus efficace *a priori* car elle survient au moment où un conseil génétique peut être nécessaire mais elle présente l'inconvénient de proposer une prise en charge tardive, ce qui peut entraîner une mauvaise acceptation du conseil génétique et de la possibilité de recourir à un diagnostic prénatal. Dans de nombreux pays concernés par la thalassémie, l'interruption médicale de grossesse reste impossible.

En France, un programme de dépistage systématique des hétérozygotes en milieu scolaire a été mené dans la région de Marseille dans les années 1980 mais l'expérience n'a pas été prolongée pour des raisons financières [22].

### 6.3. Le diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal est proposé systématiquement aux couples à risque de transmettre une bêta-thalassémie majeure. La caractérisation des mutations doit être faite au préalable mais ne pose en général pas de problèmes techniques. Le prélèvement fœtal peut être réalisé dès la 10<sup>e</sup> semaine de grossesse et le résultat d'examen de diagnostic prénatal est obtenu en une dizaine de jours. Une trentaine de diagnostics prénataux est ainsi réalisée chaque année pour un risque de bêta-thalassémie majeure. Il est également possible de réaliser un diagnostic préimplantatoire. Cette option est choisie par les couples soit parce qu'ils présentent une infertilité soit en raison d'une opposition à une interruption de grossesse. La procédure est identique à une FIV. Avant réimplantation, les embryons obtenus *in vitro* sont testés par biologie moléculaire pour rechercher les mutations bêta-thalassémiques.

Cette procédure permet d'éviter les risques de fausse-couche spontanée dus au prélèvement fœtal ainsi que l'éventualité d'une interruption médicale en cas de fœtus atteint. Toutefois les taux de succès sont faibles (environ 20 % de grossesses menées à terme pour chaque tentative de FIV). Ne sont réimplantés que les embryons non porteurs des mutations ou porteurs hétérozygotes.

## 7. La situation épidémiologique en France

En France, la fréquence des hétérozygotes à l'échelle de la population est d'environ 0,5 % avec 9 à 10 naissances de formes majeures ou intermédiaires de bêta-thalassémie par an. Ces chiffres masquent néanmoins de grandes disparités régionales puisque la grande majorité des malades est recensée dans les grands bassins urbains (Paris, Lyon et Marseille) où se concentre la majorité de la population immigrée de pays à risque. Le centre de référence français des thalassémies a été labellisé en 2006 à l'occasion du premier plan National Maladies Rares ([www.chu-lyon.fr/web/2652](http://www.chu-lyon.fr/web/2652)) et est localisé à l'hôpital de la Timone à Mar-



seille. Quatorze centres de compétence pour les maladies rares du globule rouge, répartis sur le territoire, ont également été désignés en 2008 (liste sur [www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/FR/Liste\\_des\\_centres\\_de\\_reference\\_labellises.pdf](http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/FR/Liste_des_centres_de_reference_labellises.pdf)). Enfin, depuis quelques mois, une filière 'Pathologie du globule rouge' a été créée dans le cadre du Plan National Maladies Rares 2. Son but est de coordonner les actions et les projets de recherche futurs relatifs au globule rouge et de regrouper les principaux acteurs cliniques, biologiques et chercheurs travaillant sur ce thème en France afin de rendre lisible l'offre de soins aux malades.

## 8. Le registre national de patients atteints de thalassémie

Ce registre a été mis en place en 2006 à la faveur de la création du centre de référence Thalassémie. Il a pour but de collecter des données épidémiologiques, cliniques et biologiques sur les patients thalassémiques vivant sur le territoire français, atteints de forme majeure ou intermédiaire, y compris les patients ayant été greffés avec succès.

Ces données sont rendues anonymes et mises à jour tous les 2 ans. Le registre répond à certains critères qui lui ont permis d'être labellisé « registre maladies rares » et de bénéficier d'un soutien financier de l'INVS et de l'Inserm. L'analyse des données collectées permet de décrire précisément la répartition des malades sur le territoire, d'évaluer la qualité et les évolutions de leur prise en charge, de suivre l'apparition de complications rares liées à l'augmentation de la durée de vie des patients. La constitution de ce registre a eu également un rôle très important dans la diffusion des recommandations nationales pour la prise en charge clinique et facilite la réalisation d'études et d'essais cliniques. Initialement destiné à recueillir des données sur les patients bêta-thalassémiques, le registre a été récemment étendu aux patients alpha-thalassémiques.

Actuellement le registre compte 612 patients bêta-thalassémiques et 80 patients alpha-thalassémiques. Les patients sont répartis sur l'ensemble du territoire et bénéficient de la même prise en charge quelle que soit la région.

**Conflits d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

## Références

- [1] Joly P, Pondarre C, Badens C. [Beta-thalassemias: molecular, epidemiological, diagnostic and clinical aspects]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2014 Nov-Dec;72(6):639-68.
- [2] Giambona A, Passarello C, Renda D et al. The significance of the hemoglobin A2 value in screening for hemoglobinopathies. *Clin Biochem* 2009; 42 : 1786-96.
- [3] Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev* 2003; 17 : 43-53.
- [4] Patricia Aguilar-Martinez, Catherine Badens, Nathalie Bonello-Palot, et al. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. *Annales de Biologie Clinique*. 2010;68(4):455-464.
- [5] Melis MA, Rosatelli C, Falchi AM, et al. Hematological characteristics of sardinian alpha-thalassemia carriers detected in a population study. *Acta Haematol*. 1980; 63(1):32-6.
- [6] Al-Sweedan SA, Jaradat S, Iraqi M, et al. The prevalence of factor V Leiden (G1691A), prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations in Jordanian patients with beta-thalassemia major. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2009 Dec;20(8):675-8.
- [7] Forget BG. Molecular Genetics of the human globin genes. In: Steinberg MH, Forget BG, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. *Disorders of hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and clinical management*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2001. p. 117-30.
- [8] Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010 May 28;5:13.
- [9] Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Lafionatis S, et al. A rare example that coinheritance of a severe form of beta-thalassaemia and alpha-thalassaemia interact in a "synergistic" manner to balance the phenotype of classic thalassaemic syndromes. *Blood Cells Mol Dis*. 2004 32(2):319-24.
- [10] Thein SL. Genetic modifiers of the beta-haemoglobinopathies. *Br J Haematol*. 2008;141,357-366.
- [11] Garner C, Tatu T, Reittie JE, et al. Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study. *Blood*. 2000;95(1):342-6.
- [12] Thein SL, Sampietro M, Rohde K, et al. Detection of a major gene for heterocellular hereditary persistence of fetal haemoglobin after accounting for genetic modifiers. *Am J Hum Genet*. 1994; 54(2):214-28.
- [13] Thein SL, Menzel S, Peng X, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(27):11346-51.
- [14] Menzel S, Garner C, Gut I, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet*. 2007;39(10):1197-9.
- [15] Uda M, Galanello R, Sanna S, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of betathalassaemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 105(5):1620-5.
- [16] Sedgewick AE, Timofeev N, Sebastiani P, et al. BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with beta-hemoglobinopathies. *Blood Cells Mol Dis*. 2008; 41(3):255-8.
- [17] Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*. 2008; 322(5909):1839-42.
- [18] Thuret I. [Clinical management of beta-thalassaemia]. *Rev Prat*. 2014 Oct;64(8):1132-7. French.
- [19] Thuret I. Post-transfusional iron overload in the haemoglobinopathies. *C R Biol*. 2013 Mar;336(3):164-72.
- [20] Musallam KM, Taher AT, Cappellini MD, et al. Clinical experience with fetal hemoglobin induction therapy in patients with  $\beta$ -thalassaemia. *Blood*. 2013 Mar 21;121(12):2199-212.
- [21] Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMG2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia. *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):318-22.
- [22] Lena-Russo D, Badens C, Aubinaud M, et al. Outcome of a school screening progra

# Dépistage néonatal de la drépanocytose

Allaf Bichr<sup>a</sup>, Couque Nathalie<sup>b</sup>, Benkerrou Malika<sup>c,d</sup>

## RÉSUMÉ

Le dépistage néonatal de la drépanocytose, maladie génétique la plus fréquente en France, permet un diagnostic précoce de toutes les formes de syndromes drépanocytaires majeurs (homozygote S, hétérozygote composite S/bêta-thalassémie ou S/C). Il est réalisé à partir d'un prélèvement sur papier buvard avec une première technique de chromatographie liquide haute performance et confirmé, dans le cas d'une anomalie, par une deuxième technique de type électrophorétique (ou inversement). Le dépistage néonatal n'est utile que lorsqu'il s'inscrit dans un système de soin organisé pour la prise en charge efficace des enfants atteints. Nous avons réalisé une évaluation rétrospective (1995-2009) des enfants atteints de drépanocytose diagnostiqués par le dépistage néonatal et suivis dans les hôpitaux de la région Nord-Francilienne. Nous avons recueilli le devenir des patients, la prise en charge et son adéquation avec les recommandations nationales publiées en 2005. L'efficacité du dépistage pour initier un traitement est très efficace puisque 98,7 % des malades commencent un suivi à un âge moyen de 2 mois. Les résultats de 1 033 patients avec 6 776 années-patient de suivi, dont 742 sont SS/S $\beta$ <sup>0</sup>thal, ont été analysés. La moyenne d'âge de la cohorte est de  $7,1 \pm 3,9$  ans. Dix-sept patients sont décédés à un âge moyen de 14,9 mois (rang 0,23-89 mois) avec 13 décès en rapport avec la drépanocytose observés uniquement chez des patients SS. Au total la survie des patients SS/S $\beta$ <sup>0</sup>thal est de 97,1 % à 15,8 ans (intervalle de confiance à 95 % de 95,2 à 98,3 %). Dans la cohorte, la stratégie préventive est appliquée selon les recommandations. Tous les patients bénéficient de l'antibioprophylaxie avec respect du schéma vaccinal strict pour 81 % des patients. Le risque cumulatif d'accident vasculaire cérébral est de 0,25 (0,11-0,39) pour 100 années-patient. La grande majorité des patients (97,3 %) avec une échographie transcrânienne ont une intensification thérapeutique adaptée. Cette analyse rétrospective montre l'efficacité de la prise en charge d'un nouveau patient drépanocytaire dépisté. C'est une étape préalable nécessaire à la mise en place de mesures correctives.

**Analyse rétrospective – dépistage néonatal – syndromes drépanocytaires majeurs.**

## 1. Introduction

La drépanocytose est une maladie génétique caractérisée par la présence d'une hémoglobine anormale, l'HbS, qui a la propriété de polymériser sous sa forme désoxygénée.

**a** Laboratoire de Biochimie,  
Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris, France.

**b** Laboratoire de Génétique Moléculaire,  
Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris, France.

**c** Service d'Hématologie, Centre de Référence de la Drépanocytose,  
Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris, France.

**d** Inserm 1123,  
F-75019, Paris, France

\*Correspondance :

nathalie.couque@aphp.fr

article reçu le 21 janvier, accepté le 2 février 2016

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

## SUMMARY

### Neonatal screening for sickle cell disease

Neonatal screening for sickle cell disease (SCD), the most common of recessive autosomic hemoglobin disorders, allows detection of affected babies (homozygous sickle cell disease, compound heterozygote SC, and S b-thalassemia) in a target population. A dry blood sample is obtained by heel stick and analyzed by high-performance liquid chromatography as a first-line method, followed by isoelectric focusing for confirmation, whenever a variant haemoglobin is observed on first-line method. Screening is only a component of a comprehensive system of care, including medical care. We conducted a retrospective evaluation (1995-2009) of SCD newborns outcome followed in a multicenter hospital-based network between a referral center and local specialized teams in the Northern Area of Paris. We evaluated patient's outcomes, medical care, and its adequacy to national guidelines published since 2005. Initial retrieval of SCD babies diagnosed through newborn screening was very efficient with 98.7 % starting follow-up at a median age of 2 months. Data from 1 033 subjects with 6 776 patient-years of follow-up were analyzed among whom 742 had SS or S $\beta$ <sup>0</sup> thalassemia. Mean age of the cohort is  $7.1 \pm 3.9$  years. Seventeen patients died at a median age 14.9 months (range 0.23-89) with 13 SCD related deaths at a median age of 23 months (range 5.5-89), all with sickle cell anemia (SS). Overall survival in SS/Sb0 patients was 97.1 % at 15.8 years (95 %IC: [95.2; 98.3]). In the cohort, preventive strategy was applied as recommended. All patients were under Peni V prophylaxis with 81 % of long term optimal schedule of pneumococcal immunization. The cumulative risk of overt stroke was 0.25 per 100 patient years (0.11; 0.39). 97.3 % of the patients with abnormal TCD have correct intensification therapy. The good results on SCD mortality and morbidity could be improved in this recently immigrated population by programs combining a territorial team with educated multi-ethnic staff and web-conferences on all at risk patients between referral center and local teams.

**Retrospective evaluation – newborn screening – sickle cell disease.**

Cette polymérisation est à l'origine d'une déformation des hématies en forme de faucille (drépanocytes) à l'origine de la physiopathologie de la maladie. Les syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) regroupent les différentes formes génétiques existantes de drépanocytose. Ainsi, sont considérés comme atteint d'un SDM les patients : homozygote S,

forme la plus fréquente, mais aussi les patients hétérozygotes composites de type S/C, S/β<sup>0</sup>thalassémie, S/β<sup>+</sup>thalassémie, S/D-Punjab, S/O-Arab, S/E, ou les rares hétérozygoties symptomatiques type A/S<sup>Antilles</sup>.

La drépanocytose est une pathologie grave à prendre en charge avant l'apparition des complications sévères qui peuvent se manifester dès 3 mois de vie. Les enfants drépanocytaires présentent notamment une susceptibilité accrue aux infections aiguës sévères par *Streptococcus pneumoniae* (septicémie, méningites, pneumonies), aux séquestrations spléniques aiguës avec épisode d'anémie parfois très sévère, aux crises vaso-occlusives (CVO) douloureuses et à un risque redoutable d'accident vasculaire cérébral. Ces complications, parfois inaugurales, sont à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité précoce importante. Il est maintenant parfaitement établi qu'une prise en charge précoce des sujets atteints induit une réduction significative de la morbidité et la mortalité [1].

L'objectif principal du dépistage néonatal de la drépanocytose est de réduire la morbidité et la mortalité précoce grâce à la mise en place d'une prévention efficace chez les sujets atteints. Des recommandations nationales de prise en charge et de suivi des enfants drépanocytaires ont été publiées en 2005 et révisées en 2010 [2,3]. La prévention des infections (septicémie, méningite, pneumonies) repose sur l'antibioprophylaxie par pénicilline V (Oraciline®) à partir de l'âge de deux mois associée au respect strict du programme vaccinal renforcé pour les vaccins anti-pneumococciques [4]. La prévention de la mortalité infectieuse et anémique aiguë, notamment les séquestrations spléniques, ainsi que la morbidité douloureuse repose sur l'éducation des parents en leur permettant de reconnaître les signes d'aggravation de l'anémie, la présence de la splénomégalie, de consulter en cas de fièvre pour bilan et antibiothérapie bactéricide probabiliste anti-pneumococcique, d'éviter les situations à risque de crises douloureuses et de les prendre en charge de manière adaptée le cas échéant. La prévention des complications cérébro-vasculaires repose sur la réalisation systématique d'échographie-doppler transcrânienne (EDTC) à la recherche d'anomalie de la vitesse de circulation dans les carotides internes et les branches [5]. Elle reste basée sur un traitement transfusionnel au long cours.

À l'image d'autres pays européens, les SDM sont fréquents dans les grands centres urbains. Leur fréquence reflète l'importance et la nature des flux migratoires des dernières années. Ainsi, la drépanocytose est la maladie génétique la plus fréquente dans la population française avec une incidence de 1/1 708 dans la population générale [6].

## 2. Organisation du dépistage néonatal de la drépanocytose en France

Le dépistage néonatal de la drépanocytose est organisé par l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE). Il a débuté par des expériences pilotes en Guadeloupe et en Martinique dès 1981, et est depuis 1989 réalisé chez tous les nouveau-nés des Antilles, de Guyane, puis de la Réunion et de Mayotte. En métropole, où il a été étendu progressivement de 1995 à 2000 à l'ensemble du territoire, le dépistage de la drépanocytose est ciblé et ne concerne que les enfants à risque en raison de l'origine géographique de leurs parents [7,8].

Le dépistage de la drépanocytose a été intégré au programme national de dépistage systématique déjà existant : phénylcétonurie qui a commencé en 1972, l'hypothyroïdie congénitale depuis 1978, hyperplasie congénitale des surrénales en 1995 et complété ultérieurement par la mucoviscidose depuis 2002. Ce programme est financé et pris en charge par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (CNAMTS).

Le dépistage néonatal implique la participation de nombreux professionnels de santé intervenant de la naissance à la maternité jusqu'à la prise en charge et au suivi médical à long terme des enfants malades. Au niveau des maternités, les sages-femmes ou puéricultrices sont chargées du ciblage, de l'information et du prélèvement des nouveau-nés à risque de drépanocytose. Le ciblage est basé sur des critères définis essentiellement sur l'origine géographique des parents (**tableau I**). Les nouveau-nés sont prélevés à 72 h de vie, en même temps que les autres dépistages, par prélèvement capillaire au talon et recueil sur papier buvard. Une première partie du buvard, détachable, est réservée au recueil des taches de sang. La deuxième partie permet le recueil des informations concernant le nouveau-né : données démographiques (nom, prénom, date de naissance, sexe), données cliniques (poids, terme, transfusion éventuelle) et données administratives (maternité de naissance, adresse et téléphone des parents pour pouvoir les contacter en cas de dépistage positif, éventuellement médecin traitant). Les prélèvements sont acheminés par voie postale à température ambiante et à l'abri de l'humidité. Les associations régionales, qui représentent l'AFDPHE au niveau des régions, sont chargées de centraliser, d'enregistrer puis de transmettre les prélèvements aux laboratoires de biologie médicale. Ces laboratoires, au nombre de cinq sur la France (CHRU Lille, CHU Marseille et CHU Robert-Debré-Paris en métropole ; CHU Pointe à Pitre et CHU Fort de France Outre-mer), réalisent les tests

**Tableau I – Critères utilisés en métropole pour le ciblage d'un nouveau-né à risque de drépanocytose.**

**1- Les deux parents sont originaires d'une région à risque :**

- Départements d'Outre-Mer (Antilles, Guyane, Réunion, Mayotte)
- Tous les pays d'Afrique Noire, Cap Vert
- Amérique du Sud (Brésil), Noirs d'Amérique du Nord, Inde
- Océan Indien : Madagascar, Ile Maurice, Comores
- Afrique du Nord : Algérie, Tunisie, Maroc
- Pourtour méditerranéen : Italie du Sud, Sicile, Grèce, Turquie
- Moyen-Orient : Liban, Syrie, Arabie Saoudite, Yémen, Oman

**2- Un des parents est originaire d'une région à risque et l'autre d'un pays d'Asie**

**3- La mère est à risque mais le père n'est pas connu**

**4- Un des parents a connaissance d'une anomalie de l'Hb chez lui ou dans sa famille**

de dépistage et rendent l'ensemble des résultats aux associations régionales. En fonction des organisations établies, le laboratoire ou l'association régionale organise la prise en charge des enfants dépistés atteints d'un SDM en les confiant aux pédiatres spécialisés. Les pédiatres des centres de référence et des centres de proximité assurent la prise en charge et le suivi des patients.

En Ile-de-France, afin d'assurer une prise en charge et un suivi au plus près du domicile des familles, c'est le laboratoire qui prend contact avec les différents pédiatres référents ou spécialisés qui vont ensuite convoquer la famille pour réaliser l'annonce diagnostique [9]. Sur la région parisienne, les centres de références pédiatriques spécialisés de la drépanocytose sont au nombre de cinq : CHU Bicêtre, CHI Créteil, CHU Necker, CHU Robert-Debré et CHU Trousseau. Chacun de ces centres est référent pour des centres hospitaliers de proximité qui assurent la prise en charge et le suivi des enfants drépanocytaires de façon continue.

### 3. Résultats et bilan depuis le début du programme de dépistage en France

En France, depuis le début du programme du dépistage néonatal [6] et jusqu'au 31 décembre 2014, 4 727 087 nouveau-nés ont été testés, 6 747 enfants atteints de SDM ont été dépistés dont 4 856 homozygote S (S/S) (72 % des SDM dépistés), 1 386 hétérozygotes composites S/C (20,5 %), 479 S/ $\beta$ thalassémie (7,1 %), et 26 autres SDM (0,4 %).

En métropole en 2014, 37,2 % des nouveau-nés ont été ciblés pour le dépistage de la drépanocytose. Ce pourcentage varie de 8,1 % en Bretagne à 69,1 % en Ile-de-France, en fonction des flux migratoires existant dans la région.

L'essentiel des malades dépistés atteints de SDM se trouve en Ile-de-France. Ils représentent 69,4 % des malades de la métropole et 50,2 % des malades de toute la France (métropole et départements d'Outre-mer).

De plus, le dépistage néonatal permet d'identifier les sujets sains porteurs d'un mutant d'Hb. Nous citons uniquement les mutants les plus fréquents dans la population dépistée (HbS, HbC). 160 093 nouveau-nés hétérozygotes (HbS, HbC) ont été détectés, avec une incidence de 1/30 dans la population testée, en majorité porteurs d'une HbS dans 127 851 cas (79,9 %), et 32 242 porteurs d'une HbC (20,1 %). Au total, 49,2 % des sujets hétérozygotes dépistés sont en Ile-de-France.

### 4. Techniques utilisées pour le dépistage de la drépanocytose

L'objectif principal du dépistage néonatal de la drépanocytose est de repérer les patients atteints de SDM pour instaurer une prise en charge appropriée dès l'âge de 2 mois. Les techniques utilisées doivent permettre de détecter les fractions normales de l'Hb (HbF et HbA) ainsi que les variants d'hémoglobine considérés comme

cliniquement significatifs HbS, HbC, HbE, HbD-Punjab, HbO-Arab notamment. L'objectif secondaire est de dépister d'autres hémoglobinopathies sévères telles que les bêta-thalassémies majeures et les hémoglobinoses H, ainsi que le dépistage des sujets hétérozygotes.

En France, les techniques pouvant être utilisées en première intention pour le dépistage néonatal de la drépanocytose, selon les recommandations de la commission technique de l'AFDPHE, sont soit l'isoélectrofocalisation (IEF), soit la chromatographie liquide haute performance par échange de cations (CLHP-EC), soit l'électrophorèse capillaire. Tout résultat pathologique doit être confirmé par une seconde technique (de seconde intention) utilisant un principe analytique différent de la technique utilisée en première intention. L'ensemble des laboratoires réalisant le dépistage néonatal sont soumis à un contrôle qualité national.

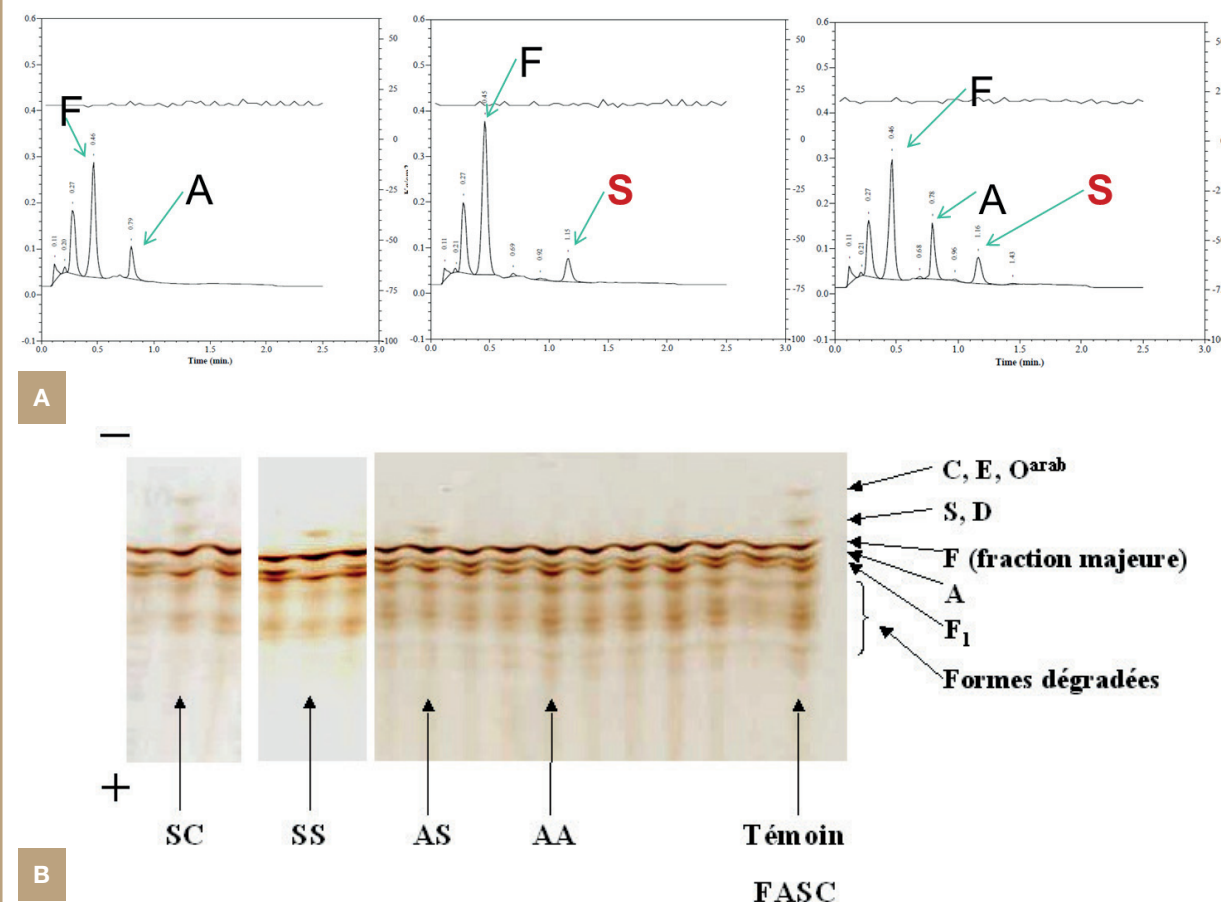
Dans notre laboratoire, nous utilisons la chromatographie liquide de haute performance sur système Variant NBS (Bio-Rad), programme « Sick cell short » comme technique de première intention (figure 1). Un résultat normal met en évidence de l'HbF et de l'HbA en rapport avec le terme ; il sera rendu FA. En cas de présence d'un variant d'hémoglobine (S, C, E, D ou X) ou en cas d'absence d'HbA, une confirmation est réalisée par technique d'IEF. Un résultat pathologique compatible avec un SDM met en évidence pour les principaux cas : i) l'absence d'HbA, la présence d'HbF et d'HbS (profil FS) : compatible avec un SDM de type homozygote S ou hétérozygote composite S/ $\beta$ thalassémique ii) l'absence d'HbA, la présence d'HbF, d'HbS et d'HbC (profil FSC) : compatible avec un SDM de type hétérozygote composite S/C ; iii) présence d'HbF et d'HbS > HbA (profil FSA) : compatible avec un SDM de type hétérozygote composite S/ $\beta$ +thalassémique. Comme précédemment décrit afin d'optimiser le rendu [10], pour tous les profils FS, nous utilisons un deuxième programme chromatographie sur un système Variant II (Bio-Rad) (programme « A1c ») afin de dépister certains variants semi-rares tels que l'Hb-Hope afin de ne pas méconnaître l'association S/Hope qui ne constitue pas un SDM.

Le défaut de sensibilité (« faux négatifs ») du dépistage néonatal doit être le plus faible possible. Des faux négatifs peuvent se voir dans deux situations principales : une grande prématurité ou une transfusion sanguine (chez le nouveau-né ou en anténatal). Dans ces situations, un contrôle du dépistage néonatal est alors demandé. Le défaut de spécificité (« faux positifs ») est aussi possible. Par exemple, un profil FS ne permet pas d'exclure que le patient soit en fait hétérozygote composite S/PHHF (persistance héréditaire de l'HbF) qui ne constitue pas un SDM.

Le résultat du dépistage néonatal doit être confirmé par une analyse de l'hémoglobine sur un prélèvement veineux de l'enfant qui sera réalisé lors de la première consultation d'annonce avec le pédiatre référent de la maladie. Il est également indispensable d'étudier l'hémoglobine des parents, afin de faire le diagnostic différentiel entre un SDM de type S/S ou S/ $\beta$ thalassémie ou, encore d'une association S/PHHF [11]. Les prélèvements de contrôle doivent être adressés à des laboratoires spécialisés disposant des techniques adéquates et connaissant bien les anomalies de l'hémoglobine.



Figure 1 – Analyses d'échantillons par HPLC et IEF.



**A.** Exemple de tracés obtenus par HPLC sur Variant NBS® (Bio-rad) : profil normal (FA), profil pathologique compatible avec un syndrome drépanocytaire majeur (FS), profil hétérozygote AS (FAS).  
**B.** Exemple de tracé obtenu par isoélectrofocalisation.

## 5. Évaluation du dépistage néonatal de la drépanocytose dans le Nord-Francilien (NEODREP)

Après une première étude réalisée en 2001 [12], l'objectif de cette étude rétrospective a été d'évaluer l'efficacité du dépistage néonatal de la drépanocytose dans la région Nord francilienne avec évaluation de la prise en charge effective des enfants atteints et nés de 1995 à 2009. La conformité de la prise en charge de chaque enfant drépanocytaire dépisté a été évaluée en se basant sur les recommandations de la HAS [2.3] ; le taux de mortalité a été mesuré ; les complications précoces sévères et les intensifications thérapeutiques associées ont été recueillies.

### 5.1. Patients et méthodes

L'analyse a été menée sur la cohorte d'enfants drépanocytaires diagnostiqués par le dépistage néonatal de la drépanocytose et dont le centre de référence pédiatrique était le centre de la drépanocytose de l'hôpital Robert-Debré (Paris). Cette cohorte concernait des enfants nés de 1995 à 2009 dans le Nord Parisien, dans le département de Seine Saint Denis (93) et dans le département du Val d'Oise (95).

Selon les recommandations de la HAS [2], de façon initiale, la prise en charge d'un nouveau patient dépisté inclut une annonce spécifique avec confirmation du diagnostic, qui doit avoir lieu avant 2 mois, avec au décours mise en place de la prévention des infections (antibioprophylaxie par pénicilline et suivi strict du schéma vaccinal complet) et d'une supplémentation en acide folique. Ensuite, les visites médicales, initialement rapprochées à 2, 4 et 6 mois, sont espacées à environ tous les 6 mois. La redoutable complication d'accident vasculaire cérébral (AVC) doit être prévenue par la recherche d'une anomalie des flux cérébraux par échographie-doppler transcrânienne (EDTC) à partir de 12-18 mois. La mise en évidence d'une accélération des flux, avec une vitesse  $\geq 200$  cm/s, nécessite la mise en place d'un programme transfusionnel afin de prévenir l'AVC. Pour les besoins de l'étude, un suivi annuel a été considéré comme correct dès lors qu'il présentait : a) deux visites médicales minimum par an, b) un bilan biologique par an, c) chez les patients SS/S $\beta^0$  un EDTC tous les 2 ans dès l'âge de 12-18 mois, d) une échographie abdominale tous les 2 ans dès l'âge de 3 ans et e) un fond d'œil tous les 2 ans dès l'âge de 6 ans chez les patients SC, dès 10 ans pour les autres. Les patients présentant une vasculopathie cérébrale (AVC ou EDTC pathologique) ou des séquestrations spléniques aiguës avant l'âge

de 2 ans doivent bénéficier d'un programme transfusionnel. Les patients présentant des crises vaso-occlusives sévères (CVO) nécessitant une hospitalisation ( $\geq 3$  CVO/an) ou  $> 1$  syndrome thoracique aigu (STA) doivent bénéficier d'un programme transfusionnel avant l'âge de 2 ans et d'un traitement par hydroxycarbamide (HC) à partir de l'âge de 2 ans. Les patients présentant une anémie chronique (Hb  $< 7$  g/dL) doivent bénéficier d'un traitement par HC. Une greffe de moelle géno-identique est proposée aux patients présentant une vasculopathie cérébrale ou des CVO sévères persistantes malgré un traitement par HC bien conduit.

Nous avons recueilli les données de prise en charge initiale (âge d'annonce diagnostique, antibioprophylaxie par la pénicilline, schéma vaccinal), les données de mortalité et les données de complications sévères précoces qui nécessitent une prise en thérapeutique spécifique ( $\geq 3$  CVO sévères/an,  $> 1$  STA, EDTC pathologique confirmé, AVC et anémie chronique avec Hb  $< 7$  g/dL) ainsi que les intensifications thérapeutiques (programme d'échange transfusionnel, traitement par HC, greffe de moelle géno-identique). L'ensemble des données ont pu être recueillies grâce à la collaboration active de l'ensemble des pédiatres assurant le suivi des enfants.

## 5.2. Résultats

Les caractéristiques de la cohorte sont décrites dans le **tableau II**. Entre 1995 et 2009, 1 047 cas ont été diagnostiqués. Quatorze enfants n'ont jamais pu être retrouvés après le dépistage néonatal (soit 1,3 %). Au total, 1 033 patients ont pu être évalués avec 6 776 années-patients de suivi et un âge moyen de la cohorte de  $7,1 \pm 3,9$  ans. Parmi les 60 patients perdus de vue, la moitié l'est au décours d'un déménagement. La moyenne d'âge des perdus de vue est  $3,2 \pm 3,4$  ans. Comme décrit par ailleurs [13], les patients SC ou S $\beta$ +thal sont plus sujets à être perdus de vue que les patients SS ou S $\beta$ thal (11 % vs 3,8 %,  $p = 0.002$ ).

La première consultation est réalisée en moyenne à un âge moyen de 2,0 [1,5 ; 2,7] mois avec une grande majorité de patients (92,7 %) vus avant 3,5 mois. Tous les patients sont mis sous antibioprophylaxie par Peni V ainsi qu'une supplémentation en acide folique excepté 1 patient. L'antibioprophylaxie par Peni V a été arrêtée chez 8,9 % des patients à un âge moyen de  $11,3 \pm 2$  ans. Un schéma vaccinal strict a été respecté chez 81 % des patients.

Au total, 17 patients sont décédés à un âge moyen de 14,9 mois (min 0,2 et max 89,0). La survie à 15,8 ans est de 97,1 % (intervalle de confiance à 95 % de 95,2 à 98,3) chez les sujets SS et S $\beta$ thal et 99,6 % (intervalle de confiance à 95 % de 97,4 à 99,9) chez les patients SC et S $\beta$ +thal. Concernant la cause des décès, on distingue ceux en rapport avec la drépanocytose et ceux sans rapport avec la maladie. Parmi ces derniers, sont inclus 4 décès dont 3

**Tableau II : Caractéristiques de la cohorte.**

|                                                                       | SS/S $\beta$ <sup>°</sup><br>n = 742 | SC/S $\beta$ +<br>n = 291 | Total<br>n = 1 033 |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| <b>Génotype</b>                                                       |                                      |                           |                    |
| SS                                                                    | 713 (96,1 %)                         | -                         | 713 (69,0 %)       |
| S $\beta$ <sup>°</sup>                                                | 28 (3,8 %)                           | -                         | 28 (2,7 %)         |
| SD-Punjab                                                             | 1 (0,1 %)                            | -                         | 1 (0,1 %)          |
| SC                                                                    | -                                    | 215 (73,9 %)              | 215 (20,8 %)       |
| S $\beta$ +<br>SE                                                     | -                                    | 74 (25,4 %)               | 74 (7,2 %)         |
|                                                                       | -                                    | 2 (0,7 %)                 | 2 (0,2 %)          |
| <b>Sexe masculin</b>                                                  | 384 (51,8 %)                         | 156 (53,6 %)              | 540 (52,3 %)       |
| <b>Origine familiale</b>                                              |                                      |                           |                    |
| Afrique de l'Ouest                                                    | 256 (34,5 %)                         | 119 (41 %)                |                    |
| Golfe du Bénin                                                        | 101 (13,5 %)                         | 85 (29 %)                 |                    |
| Afrique centrale                                                      | 216 (29 %)                           | 13 (4,5 %)                |                    |
| Antilles                                                              | 93 (13 %)                            | 47 (16 %)                 |                    |
| Autres                                                                | 22 (3 %)                             | 14 (5 %)                  |                    |
| Mixte                                                                 | 54 (7 %)                             | 13 (4,5 %)                |                    |
| <b>Age (ans)</b>                                                      | $7,2 \pm 3,9$                        | $7,1 \pm 3,9$             | $7,1 \pm 3,9$      |
| <b>Patient-années de suivi</b>                                        | 4 938                                | 1 838                     | 6 776              |
| <b>Évalués dans les 2 dernières années + statut vital uniquement*</b> | 684+14*(94,1 %)                      | 257+1*(88,6 %)            | 941+15*(92,5 %)    |
| <b>Perdus de vue</b>                                                  | 28 (3,8 %)                           | 32 (11,0 %)               | 60 (5,8 %)         |
| <b>Décédés</b>                                                        | 16 (2,2 %)                           | 1 (0,3 %)                 | 17 (1,7 %)         |

\* Patients pour lesquels seul le statut vital a été retrouvé.

Valeurs indiquées : moyenne  $\pm$  déviation standard et nombres (pourcentages).

très précoces au cours de la période néonatale (cardiopathie congénitale, prématurité, infection fœto-maternelle) et 1 impliquant un suicide par défenestration de la mère avec son enfant. Les 13 décès en rapport avec la drépanocytose ne sont observés que chez des patients SS et sont liés soit à des anémies ( $n = 5$ , dont 2 au cours d'un voyage en Afrique), soit à des infections par Pneumocoque ( $n = 3$ ), soit à un STA ( $n = 1$ ), soit à une déshydratation ( $n = 1$ ), soit à un AVC ( $n = 1$ ), soit d'origine inconnue ( $n = 2$ , dont 1 au cours d'un voyage en zone subsaharienne). L'incidence de la mortalité (**tableau III**) de notre cohorte est similaire à celles décrites dans les cohortes contemporaines [14-16]. Deux caractéristiques sont à noter : i) l'âge de la mortalité qui reste précoce et ii) les décès au cours d'un voyage en zone tropicale. La précocité des décès non liée à la drépanocytose est probablement en partie en rapport avec les importantes difficultés socio-économiques de la région étudiée où, indépendamment de la drépanocytose, la mortalité néonatale est 1,5 fois supérieure à la moyenne nationale [17]. Les décès survenant en zone tropicale ne sont pas décrits dans les cohortes américaines ou anglaises [13-15]. Ces décès décrits dans une autre cohorte française [16], soulignent l'importance de la préparation au voyage ainsi que le suivi des consignes médicales [18].

**Tableau III : Incidence des décès (toutes causes confondues) parmi les patients SS/S $\beta$ <sup>°</sup>.**

| Référence              | Localisation | Suivi moyen (années) | Nombre de patients | Années-patient suivi | Nombre de décès | Incidence mortalité |
|------------------------|--------------|----------------------|--------------------|----------------------|-----------------|---------------------|
| Quinn <i>et al</i>     | Dallas       | 9,2                  | 593                | 5 819                | 29              | 0,52                |
| Telfer <i>et al</i>    | Londres      | 7,4                  | 180                | 1 542                | 4               | 0,26                |
| Bernaudin <i>et al</i> | Créteil      | 6,2                  | 217                | 1 609                | 4               | 0,25                |
| Neodrep                | Paris Nord   | 7,2                  | 742                | 4 938                | 16              | 0,32                |

**Tableau IV : complications sévères de la drépanocytose au sein de la cohorte.**

|                        | groupe SS/Sb <sup>a</sup><br>n = 740 <sup>a</sup> | groupe SC/Sb+<br>n = 291 | Total<br>n = 1031 <sup>a</sup> |
|------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| - ≥ 3 CVO/an           | 97 (13,1 %)                                       | 3 (1,0 %)                | 100 (9,7 %)                    |
| - > 1 STA              | 64 (8,6 %)                                        | -                        | 64 (6,2 %)                     |
| - AVC                  | 12 (1,6 %)                                        | -                        | 12 (1,1 %)                     |
| - EDTC pathologique    | 76 (10,2 %)                                       | -                        | 76 (7,3 %)                     |
| - anémie (Hb < 7 g/dL) | 80 (10,8 %)                                       | -                        | 80 (7,7 %)                     |

<sup>a</sup> Deux patients exclus car décédés dans les premiers jours de vie  
CVO : crise vaso-occlusive, STA : syndrome thoracique aigu, AVC : accident vasculaire cérébral, EDTC : échographie-doppler transcrânienne, Hb : hémoglobine.  
Valeurs indiquées en nombre (%).

À noter, que chez les sujets SS, les décès en rapport avec la drépanocytose sont significativement plus importants parmi les patients non-compliants ( $p = 0.01$ ), c'est-à-dire avec un suivi irrégulier (plus d'une visite médiale/an non honorée).

Les complications sévères observées dans notre cohorte sont résumées dans le **tableau IV**. Cette étude confirme que le groupe de sujet SC et Sβ+thal présente une évolution clinique beaucoup moins sévère que les sujets SS/Sβ+thal [19]. En effet, seulement 1 % des patients SC/Sβ+thal ( $n = 3$ ) présentent une complication sévère en l'occurrence de type vaso-occlusive ( $\geq 3$  CVO/an). À noter, qu'aucun de ces patients n'a bénéficié d'une prise en charge thérapeutique adaptée pour cette complication. Chez les sujets SS/Sβ+thal, 69,9 % ( $n = 517$ ) n'ont présenté aucune des complications sévères recensées. Les complications vaso-occlusives sévères ( $\geq 3$  CVO/an) et/ou > 1 STA sont observés chez respectivement 13 % ( $n = 97$ ) et 8,6 % ( $n = 64$ ) des patients. Un AVC est observé chez 1,6 % ( $n = 12$ ) des patients à un âge moyen de 3,5 ans. De plus, 10,2 % ( $n = 76$ ) des patients SS/Sβ+thal présentent un EDTC pathologique à un âge médian de 4,4 ans. Enfin, 10,8 % ( $n = 80$ ) des patients ont une anémie chronique (Hb < 7 g/dL).

Parmi les 100 patients souffrants de  $\geq 3$  CVO/an, 80 ont reçu une intensification thérapeutique. La thérapeutique utilisée est en résumé l'HC seule pour 58 ou HC et programme transfusionnel pour 16. Deux patients ont décliné le traitement. Au total, 18 % des patients ( $n = 18$ ) n'ont pas bénéficié d'une intensification thérapeutique. À noter que l'HC a été prescrite en première intention chez seulement 60 % des patients éligibles avec CVO sévère.

Parmi les 64 patients avec > 1 STA, 58 ont reçu une intensification thérapeutique. La thérapeutique utilisée est en résumé : HC seule pour 41 patients, HC et programme transfusionnel pour 13. Un patient a décliné le traitement. Au total, seulement 7,8 % des patients ( $n = 5$ ) n'ont pas bénéficié d'une intensification thérapeutique. À noter que l'HC a été prescrite en première intention chez seulement 64 % des patients éligibles avec STA.

Tous les patients ayant subi un AVC sont sous un programme d'échange transfusionnel. Deux d'entre eux ont pu bénéficier d'une greffe de moelle géno-identique.

Parmi les 76 patients avec un EDTC pathologique, 73 ont reçu une intensification thérapeutique. La thérapeutique utilisée est en résumé : programme transfusionnel seul pour 33 patients, programme transfusionnel suivi d'HC pour 23 patients, greffe de moelle pour 9 patients. Un patient a décliné le traitement. Au total, seulement 2,7 % des patients

( $n = 2$ ) n'ont pas bénéficié d'une intensification thérapeutique. Parmi les patients avec une anémie chronique ( $n = 80$ ), un pourcentage relativement bas de patients, c'est-à-dire 62,5 % ( $n = 50$ ), ont reçu une intensification thérapeutique essentiellement pour d'autres complications que l'anémie. Ainsi l'HC a été prescrite en première intention chez seulement 18 patients, soit 30,5 % des patients éligibles ( $n = 59$ ) sans pathologie cérébro-vasculaire, ni séquestration splénique.

Des résultats plus complets de cette étude avec mesure de l'impact avant/après la publication des recommandations nationales ont été récemment publiés [20].

## 5.3. Discussion

Cette cohorte est la plus importante actuellement décrite en Europe. Elle est homogène puisque l'ensemble des patients ont été diagnostiqués à la naissance et ont bénéficié d'une prise en charge précoce avec antibioprophylaxie par pénicilline dès 2 mois et une couverture vaccinale identique. L'organisation mise en place est très efficace pour assurer la prise en charge initiale des patients diagnostiqués par le dépistage néonatal : en effet, 98,7 % des enfants démarrent un suivi. Moins de 6 % des patients sont perdus de vue, essentiellement au décours d'un déménagement qui doit être mieux anticipé et géré par les équipes soignantes. La prise en charge initiale et les préventions sont bien mises en place : moyenne d'âge à l'annonce de 2 mois, tous les enfants sous antibioprophylaxie et programme vaccinal bien respecté. Les causes de décès identifiées sont essentiellement l'anémie et l'infection. Les complications précoces sévères recensées concernent 30 % des patients les plus sévères SS et Sβ+thal et 1 % des patients les moins sévères SC et Sβ+thal. L'analyse des intensifications thérapeutiques met en lumière une sous-prescription de l'HC, tout particulièrement pour les complications de type anémie chronique.

## 6. Conclusion

Cette analyse rétrospective montre l'efficacité de la prise en charge initiale d'un nouveau patient drépanocytaire dépisté. Le dépistage est une composante d'un dispositif global de prise en charge, incluant les soins médicaux et psychosociaux ainsi que la possibilité d'offrir un conseil génétique. Cette évaluation est un préalable indispensable à la proposition d'éventuelles mesures correctrices.

### Remerciements

Nous remercions l'ensemble des personnes ayant participé à l'étude Néodrep : Rolande Ducrocq et Zinedine Haouari pour le recueil de données et l'analyse ; Delphine Girard, Priscilla Boizeau, Corinne Alberti pour le design de l'étude et les analyses statistiques ; l'ensemble des pédiatres participant au suivi des enfants : F. Missud, L. Holvoet, G. Ithier (Robert Debré/Paris) ; E. Questiaux, M. Belloy (Aulnay-sous-Bois) ; MH. Odièvre (Louis-Mourier/Colombes) ; M. Benemou (Gonesse) ; P. Benhaim (Jean-Verdier/Bondy) ; B. Retali (Pontoise) ; C. Allisy, P. Bensaid (Argenteuil) ; B. Monier (Montmorency) ; V. Brousse, M. de Montalembert (Necker-Paris) ; R. Amira (Saint-Denis) ; C. Orzechowski (Bry-sur-Marne) ; E. Lesprit, B. Quinet (Trousseau/Paris) ; L. Mangyanda (Beaumont-sur-Oise) ; N. Garrec (Lagny-sur-Marne) ; A. May (Corbeil/Essonnes) ; M. Duval-Arnould (Creil) ; F. Bernaudin, C. Arnaud (Créteil) ; C. Guillon (Kremlin-Bicêtre) ; F. Gouraud (Meaux) ; P. Ferré (Montreuil-sous-Bois) ; O. Charara (Versailles).

**Conflits d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

## Références

- [1] Vichinsky E., Hurst D., Earles A., Kleman K. & Lubin B. Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. *Pediatrics* 81, 749–755 (1988).
- [2] Proposition de présentation des documents de recommandations et références professionnelles - Drepanocytose.rap.pdf. at [www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/Drepanocytose.rap.pdf](http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/Drepanocytose.rap.pdf)
- [3] ALD\_10\_Guide\_drepano\_adulte\_WEB - ald\_10\_guide\_drepano\_adulte\_web.pdf. at [www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/201004/ald\\_10\\_guide\\_drepano\\_adulte\\_web.pdf](http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/201004/ald_10_guide_drepano_adulte_web.pdf)
- [4] Gaston M. H. et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. *N. Engl. J. Med.* 314, 1593–1599 (1986).
- [5] Adams R. J. et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N. Engl. J. Med.* 339, 5–11 (1998).
- [6] Rapport AFDPE 2014 [http://www.afdphe.org/sites/default/files/bilan\\_afdphe\\_2014.pdf](http://www.afdphe.org/sites/default/files/bilan_afdphe_2014.pdf)
- [7] Galactéros F. et al. Détection néonatale de la drépanocytose en France métropolitaine. *Archives de Pédiatrie* 3, 1026–1031 (1996).
- [8] Bardakdjian-Michau J. et al. Neonatal screening for sickle cell disease in France. *J. Clin. Pathol.* 62, 31–33 (2009).
- [9] Niakaté A. et al. [Announcing the diagnosis of sickle cell disease in a newborn to the parents]. *Arch Pediatr* 16, 405–408 (2009).
- [10] Ducrocq R. et al. Strategy linking several analytical methods of neonatal screening for sickle cell disease. *J Med Screen* 8, 8–14 (2001).
- [11] Bardakdjian-Michau J. et al. [Good practices for the study of hemoglobin]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 61, 401–409 (2003).
- [12] Ducrocq R. et al. [Neonatal screening for sickle cell anemia: evaluation of a five-year experience in an area of northern Paris]. *Arch Pediatr* 8, 474–480 (2001).
- [13] Quinn C. T., Rogers, Z. R. & Buchanan, G. R. Survival of children with sickle cell disease. *Blood* 103, 4023–4027 (2004).
- [14] Quinn C. T., Rogers, Z. R., McCavit, T. L. & Buchanan, G. R. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. *Blood* 115, 3447–3452 (2010).
- [15] Telfer P. et al. Clinical outcomes in children with sickle cell disease living in England: a neonatal cohort in East London. *Haematologica* 92, 905–912 (2007).
- [16] Bernaudin F. et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood* 117, 1130–1140; quiz 1436 (2011).
- [17] Etat de santé en Ile-de-France : éléments de diagnostic. at [www.ars.iledefrance.sante.fr/Etat-de-sante-en-Ile-de-France.104100.0.html](http://www.ars.iledefrance.sante.fr/Etat-de-sante-en-Ile-de-France.104100.0.html)
- [18] Sommet J. et al. Morbidity among child travellers with sickle-cell disease visiting tropical areas: an observational study in a French tertiary care centre. *Arch. Dis. Child.* 98, 533–536 (2013).
- [19] Gill F. M. et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 86, 776–783 (1995).
- [20] Couque N. et al. Improvement of medical care in a cohort of newborns with sickle-cell disease in North Paris: impact of national guidelines (in press).



## QCM Évaluez-vous !

*Ceci est un questionnaire à choix multiples.  
Par conséquent, il est possible que certaines questions  
puissent bénéficier de plusieurs réponses possibles.  
Dans ce cas, il s'agit de les cocher toutes.*

### 1 Quelle est la structure de l'hémoglobine A2 :

- ☐ A.  $\alpha_2\beta_2$
- ☐ B.  $\alpha_2\delta_2$
- ☐ C.  $\alpha_2\gamma_2$
- ☐ D.  $\beta_4$
- ☐ E.  $\gamma_4$

### 2 Quelles propositions s'appliquent à l'hémoglobine S :

- ☐ A. Mutation  $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$
- ☐ B. Mutation  $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$
- ☐ C. Elle est fréquente en Afrique sous forme de « trait drépanocytaire »
- ☐ D. Sa migration en électrophorèse alcaline en gel est identique à celle de l'hémoglobine D
- ☐ E. Elle polymérise plus facilement que l'hémoglobine A

### 3 Parmi les anomalies suivantes, lesquelles sont responsables d'un syndrome drépanocytaire majeur ?

- ☐ A. S/C
- ☐ B. C/C
- ☐ C. S/D-Punjab
- ☐ D. S/Hope
- ☐ E. S/b0-thalassémie

### 4 Devant une HbA2 = 29 % en CLHP, quelle anomalie peut être évoquée ?

- ☐ A.  $\alpha$ -thalassémie avec 3 gènes non fonctionnels
- ☐ B.  $\beta 0$ -thalassémie hétérozygote
- ☐ C. Hétérozygotie A/D-Punjab
- ☐ D. Hétérozygotie A/E
- ☐ E. Hétérozygotie A/Lepore

### 5 Les anomalies moléculaires observées dans les anomalies qualitatives de l'Hb :

- ☐ A. ont été récemment découvertes
- ☐ B. sont essentiellement des mutations au niveau des introns
- ☐ C. altèrent la structure d'une chaîne de globine

- ☐ D. ont des conséquences physiopathologiques qui peuvent être logiquement interprétées en fonction de leur localisation dans la structure de l'Hb
- ☐ E. sont fréquentes et toujours pathologiques

### 6 Les bases moléculaires des alpha-thalassémies :

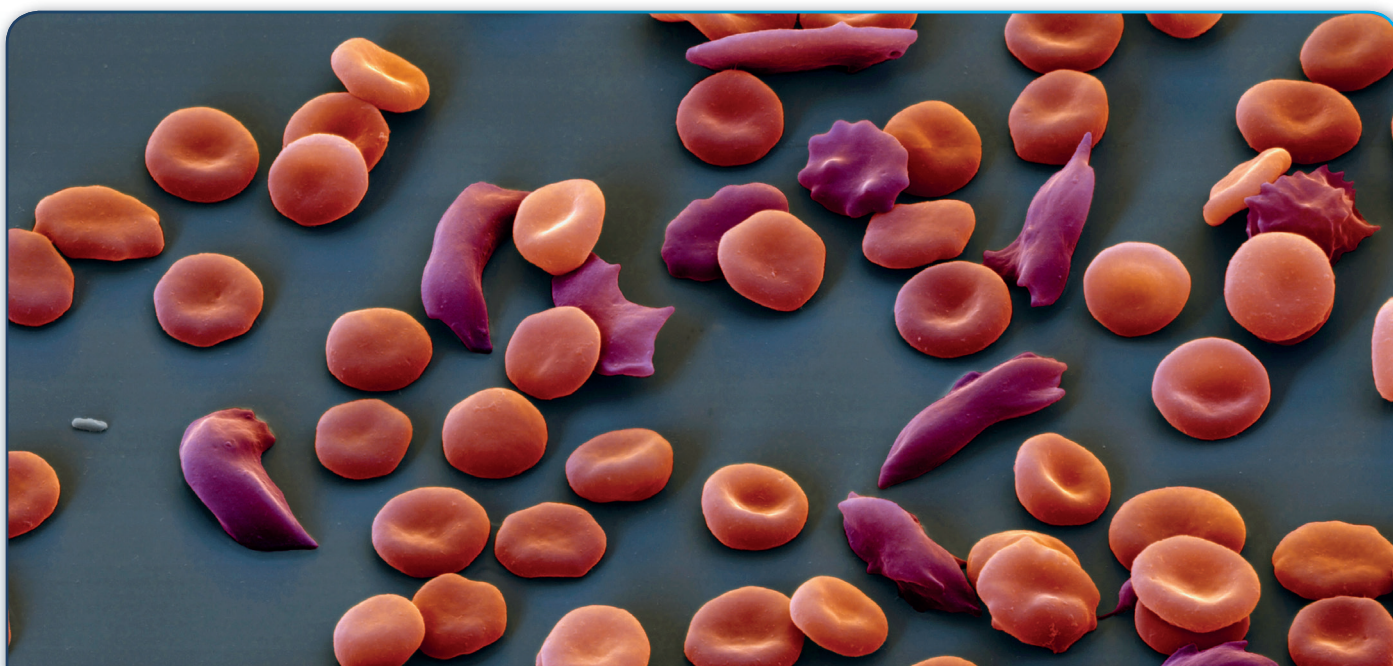
- ☐ A. Le défaut de synthèse des chaînes  $\alpha$ -globine a pour conséquence une diminution de production des différents types d'Hb dès la vie fœtale
- ☐ B. Les  $\alpha$ -thalassémies sont rares
- ☐ C. Les  $\alpha$ -thalassémies sont toujours bénignes
- ☐ D. Les anomalies moléculaires responsables d' $\alpha$ -thalassémie sont essentiellement des délétions
- ☐ E. Un patient atteint d'hémoglobinoase H doit être caractérisé par biologie moléculaire

### 7 Concernant les patients hétérozygotes AS

- ☐ A. En dehors de l'électrophorèse de l'hémoglobine, l'état bilan biologique des individus AS est strictement normal.
- ☐ B. Du fait de la concentration d'HbS, lors du test d'Itano, il n'y aura pas de précipitation de l'hémoglobine et le tube restera comme le témoin, limpide.
- ☐ C. Aucun suivi n'est recommandé.
- ☐ D. Il est important que le conjoint soit dépisté et un conseil génétique doit être fourni en cas de grossesse.
- ☐ E. Certaines activités peuvent être source de complications et doivent être évitées.

### 8 Hydroxyurée (HU)

- ☐ A. La prise d'HU s'accompagne d'une augmentation du VGM.
- ☐ B. La prise d'HU peut entraîner une leucopénie.



- ☐ C. La prise d'HU entraîne habituellement une augmentation de l'hémoglobine.
- ☐ D. C'est le traitement de fond de la drépanocytose qui présente le moins d'effets indésirables.
- ☐ E. Il faut prévenir les patients que la pleine efficacité du traitement prend 3 à 6 mois.

- ☐ B. est réalisé en même temps que les autres dépistages (hypothyroïdie, insuffisance surrénalienne, phénylcétonurie et mucoviscidose)
- ☐ C. est réalisé, en métropole, uniquement dans une population « à risque » de drépanocytose (dépistage ciblé)
- ☐ D. nécessite la mise œuvre de plusieurs techniques d'étude de l'hémoglobine
- ☐ E. ne nécessite pas de confirmation avant la prise en charge médicale

### 9 Un taux d'HbA2 égal à 5 % sans autre anomalie, est le signe

- ☐ A. d'une Hb Lepore à l'état hétérozygote
- ☐ B. d'une  $\beta$ -thalassémie hétérozygote
- ☐ C. d'une  $\alpha$ -thalassémie
- ☐ D. de l'absence d'anomalie de l'hémoglobine
- ☐ E. d'un syndrome drépanocytaire majeur

### 10 Dans quelles circonstances les résultats de l'étude de l'Hb ne sont pas interprétables?

- ☐ A. Prélèvement réalisé non à jeun
- ☐ B. Transfusion récente (< 120 jours)
- ☐ C. Pendant un traitement hypocholestérolémiant
- ☐ D. En cas de grossesse
- ☐ E. En cas de trithérapie contre une primo-infection VIH.

### 11 Le dépistage néonatal de la drépanocytose:

- ☐ A. est réalisé à partir d'une goutte de sang prélevé à 5 jours de vie

### 12 Un nouveau-né avec un résultat de dépistage néonatal de la drépanocytose pathologique, compatible avec un syndrome drépanocytaire majeur:

- ☐ A. peut présenter des complications dès l'âge de 3 mois
- ☐ B. doit bénéficier d'une antibioprophylaxie et d'une couverture vaccinale complète afin de limiter les complications infectieuses
- ☐ C. ne nécessite pas un suivi médical régulier
- ☐ D. peut présenter un accident vasculaire cérébral
- ☐ E. peut bénéficier au cours de son suivi, en préventif ou en curatif, de traitements spécifiques tels qu'un programme d'échange transfusionnel ou d'hydroxycarbamide

### RÉPONSES AUX QUESTIONS

Voir en première page de la rubrique  
Entreprise Labo, page 88

## PROBLÈME POSÉ

Lors de l'installation d'un nouvel analyseur (COBAS 6000 C501 Roche Diagnostics®), un dossier de vérification initiale a été réalisé pour tous les paramètres selon les recommandations du SH GTA04. Les valeurs de référence ont été fixées en fonction des données des fiches techniques et/ou de références bibliographiques pertinentes. S'agissant du dosage des protéines totales, la fiche technique TP2 Total Protein Gen.2 (version 8.1 de février 2014) ne précise pas si les valeurs de référence indiquées correspondent aux protéines sériques ou aux protéines plasmatiques. L'étude des références bibliographiques figurant dans la notice technique montre que les valeurs retenues ont été établies dans le sérum.

On peut se poser 3 questions :

1. Quelle(s) démarche(s) devons-nous adopter ?
2. Comment déterminer ses propres valeurs de référence ?
3. Comment les interpréter ?

## PROPOSITIONS DE RÉPONSES ET DÉMARCHES À EFFECTUER EN PRATIQUE

1

Les intervalles de référence sont définis par le laboratoire. Ce choix doit être documenté. Il est possible de se référer à l'état de l'art et/ou aux données issues de la littérature (publications scientifiques, fiches techniques, recommandations nationales ou internationales). Il est également possible de déterminer ses propres valeurs de référence. La détermination des valeurs de référence par le laboratoire peut être utile

dans différents cas de figure :

- examen en portée B (méthode adaptée ou mise au point par le laboratoire),
- absence de données dans les fiches techniques (cas de figure présenté ici),
- nécessité de valeurs de référence adaptées à une population particulière (pédiatrie, patients dialysés...).

2

Une méthodologie est proposée par le SH GTA 04 [1]. La population étudiée doit être exempte de pathologie et le nombre de dosages réalisés doit être supérieur à 100. La répartition des concentrations de l'analyte doit être gaussienne. À partir des données extraites, sont déterminés les valeurs moyennes ( $m$ ) et les écarts types ( $sd$ ). Les valeurs supérieures à ( $m + 2sd$ ) et inférieures à ( $m - 2sd$ ) sont écartées, permettant de calculer une valeur moyenne tronquée ( $m_t$ ) et l'écart type tronqué ( $sd_t$ ). L'intervalle de référence retenu par le laboratoire est alors :  $[m_t - 2 sd_t ; m_t + 2 sd_t]$ .

Nous avons appliqué ce protocole en exploitant les résultats des bilans de médecine du travail (visites médicales périodiques des personnels des centres médicaux des armées et le centre d'expertise principal du personnel navigant) fixant le postulat qu'il s'agissait de patients bien portants. Pour obtenir plus de 100 valeurs, nous avons réalisé ce travail sur une période d'un an.

La détermination des valeurs de référence des protéines plasmatiques a été réalisée à partir de 397 dosages, provenant de 13 centres médicaux des armées. Les valeurs obtenues étaient comprises entre 61,4 et 83,5 g.L<sup>-1</sup>. Après calcul des  $m$  et des  $sd$ , la  $m_t$  et le  $sd_t$  ont été calculés sur une population de 381 patients (100 femmes et 281 hommes). La moyenne d'âge était de 38 ans (minimum 17 ans, maximum 73 ans). L'intervalle de référence obtenu était de 66 à 80 g.L<sup>-1</sup>.

La détermination des valeurs de référence des protéines sériques a été conduite sur 184 dosages, provenant de 13 centres médicaux des armées. Les valeurs obtenues étaient comprises entre 59,7 et 85,7 g.L<sup>-1</sup>. Après calcul des  $m$  et des  $sd$ , la  $m_t$  et le  $sd_t$  ont été calculés sur une population de 177 patients (43 femmes et 134 hommes). La moyenne d'âge était de 39 ans (minimum 19 ans, maximum 72 ans). L'intervalle retenu par le laboratoire était de 64 à 80 g.L<sup>-1</sup>.

### Laboratoire de biochimie

Hôpital d'instruction des armées Percy  
101, av. Henri Barbusse  
92140 Clamart

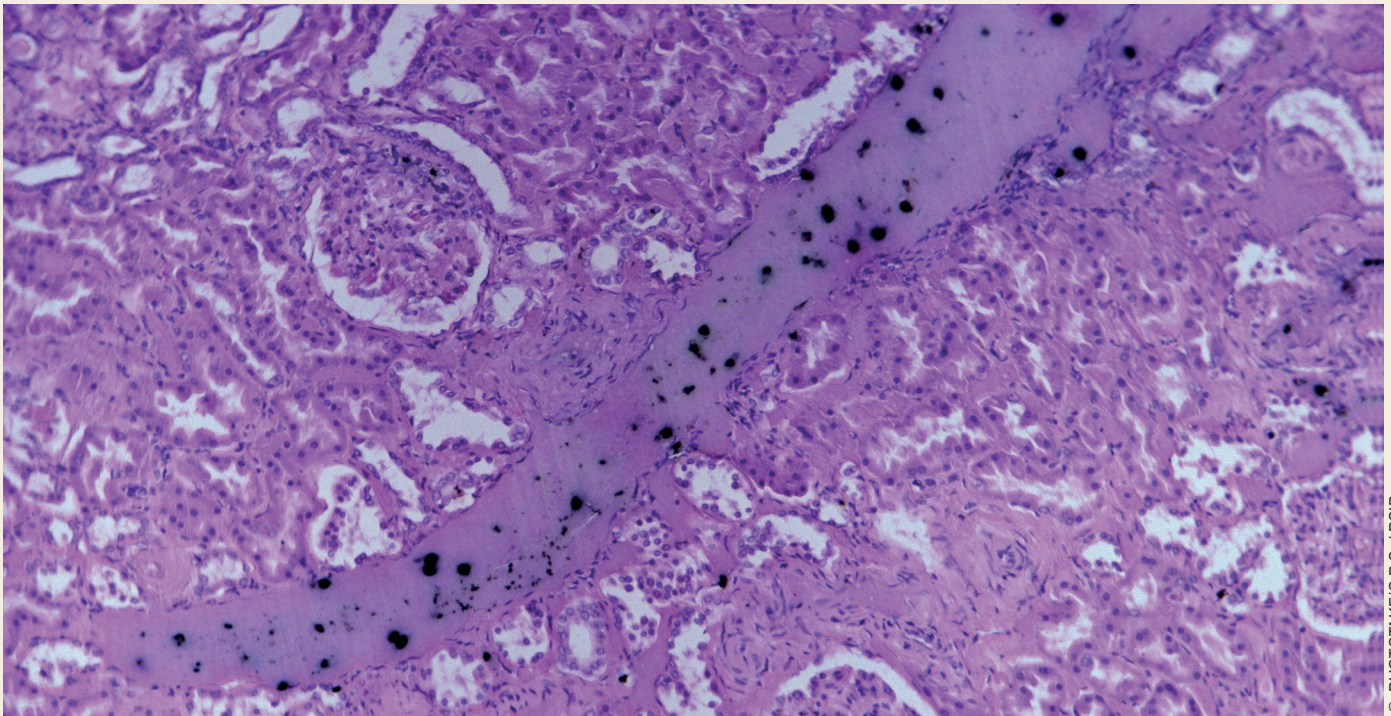
### \* Correspondance

biochimie.percy@orange-business.fr

Carine Garcia Hejl,  
Emmanuel Dedome,  
Sarah Bugier, Denis Chiane\*,  
Philippe Vest

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.





© PHOTOTAKE/C.B.S. / BSIP

Néphroangiosclérose bénigne : artériolose hyaline (histologie, coloration hématoxyline-éosine, x 30 pour une image 24 x 36 mm). Des dépôts hyalins (protéines sériques) s'accumulent dans la paroi des artérioles (hyalinose), causant son épaississement et son durcissement, allant jusqu'à la sténose.

**3** Les valeurs obtenues doivent être confrontées aux données issues de la littérature ou à l'état de l'art. Par exemple, pour les protéines, les valeurs usuelles des protéines plasmatiques doivent être proches mais légèrement supérieures à celles de protéines sériques (de 1 à 5 g.L<sup>-1</sup>) en raison de la présence du fibrinogène [4, 5]. La population étudiée doit être représentative de la population suivie par le laboratoire (répartition homme/femme ; âge...). Dans notre cas, notre population étant majoritairement constituée de patients militaires, la répartition homme/femme n'était pas équilibrée (74 % d'hommes pour les protéines plasmatiques et 76 % pour les protéines sériques). Nous avons calculé les valeurs de référence par sexe ; pour les protéines plasmatiques, les valeurs obtenues étaient identiques pour les groupes femme et homme, tous groupes confondus ; pour les protéines sériques, les valeurs étaient différentes selon le sexe, mais restaient proches, les valeurs de femmes étant plus basses de 1 à 2 g.L<sup>-1</sup> [2]. Cette différence était inférieure

à l'incertitude de mesure de notre technique (5,2 % pour des valeurs comprises dans l'intervalle de référence). Par ailleurs, dans la littérature, il n'y a pas de valeurs usuelles en fonction du sexe [2-5].

La médiane d'âge de la population étudiée était respectivement de 38,4 ans et 39,4 ans pour l'étude des protéines plasmatiques et des protéines sériques, notre population était donc assez jeune. D'après les données de la littérature, il n'y a pas de variation significative en fonction de l'âge puisque l'albuminémie tend à baisser alors que la concentration en globulines augmente, sauf lorsque l'apport alimentaire en protéines est réduit [2-3].

Nous n'avons donc pas retenu de valeurs de référence en fonction du sexe ni de l'âge. Après analyse critique des résultats, le laboratoire peut proposer aux cliniciens des intervalles de référence et des interprétations adaptés à sa patientèle.

## Pour en savoir plus

[1] Guide de validation des méthodes en biologie médicale, document SH GTA 04 révision 01, Avril 2015, et SH FROM 43. Cofrac section laboratoires, internet : <http://www.cofrac.fr>

[2] Young DS. Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests, 3<sup>rd</sup> ed Washington DC : AACCPress 2007 : 773-776.

[3] Métais P. Protéines. Biochimie Clinique vol 1. 2<sup>e</sup> éd. Paris : SIMEP 1990 : 126 -141.

[4] Dieusaert P. Protéines sériques. Guide pratique des analyses médicales, 4e éd. Paris : Maloine 2005 : 1028-9.

[5] Estepa L. Protéines totales. EMC, Elsevier Masson SAS Paris, encyclopédie médico-biologique, 90-10-0790, 2006.



## CONTENTIEUX

### Chambre de discipline Section des assurances sociales

Nous avons rarement parlé des contentieux disciplinaires et de la section des assurances sociales dans cette rubrique de RFL, ce que nous faisons régulièrement dans « Les Enjeux du Labo ». L'analyse du rapport d'activité 2014 de l'Ordre des pharmaciens sur ces sujets est l'occasion de renouer avec une pratique qui est riche d'enseignements pour les biologistes.

En complément du rapport d'activité, vous pouvez vous connecter à la base de jurisprudence de l'Ordre, accessible sur le site de l'Ordre et son Intranet <sup>(1)</sup>.

Plus de 400 décisions reflètent avec précision la motivation des juges et le quantum des sanctions adoptées.

En voici un échantillon :

#### • Décisions de la chambre de discipline du Conseil national

*Absence de fiabilité et de sécurité des actes de biologie médicale – Aggravation de la sanction d'une interdiction d'exercer la pharmacie pendant un mois dont deux semaines avec sursis, à une interdiction définitive.*

Le 28 janvier 2014, la chambre de discipline du Conseil national a estimé que le plaignant était fondé à demander l'aggravation de la sanction d'interdiction d'exercer la pharmacie pendant un mois dont deux semaines avec sursis, et a prononcé une interdiction définitive d'exercer la pharmacie. Il était reproché au Directeur du laboratoire de biologie médicale poursuivi, les dysfonctionnements suivants : défaut de recrutement d'un Directeur adjoint, insuffisance de l'effectif permanent nécessaire pour assurer, dans les conditions de sécurité et de qualité requises, tous les postes de travail ainsi que les astreintes opérationnelles, inefficacité des mesures correctives et préventives mises en place pour éviter qu'une erreur d'identification du patient ne se reproduise, non-respect du guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA), inefficacité des mesures correctives et préventives mises en place pour garantir la fiabilité des résultats rendus, défaut de paramétrage du système informatique afin

#### Rapport d'activité 2014 de l'Ordre des pharmaciens

Le Professeur Éric Fouassier présente ainsi ce rapport dans son éditorial :

« L'année 2014 s'est avérée particulièrement riche sur le plan statistique car l'ensemble des contentieux gérés par les Conseils de l'Ordre des pharmaciens est dorénavant comptabilisé. La mission de l'Ordre, qui est notamment de veiller au respect par les pharmaciens de leurs devoirs professionnels et règles déontologiques, démontre ainsi toute sa valeur et son importance et peut désormais être quantifiée de manière précise par le présent rapport d'activité. Parmi les événements notables, il est à signaler la parution du décret relatif aux procédures de contrôle de l'insuffisance professionnelle et aux règles de suspension temporaire des pharmaciens, en date du 26 mai 2014, permettant désormais aux Conseils de l'Ordre de contrôler la compétence professionnelle des pharmaciens, au cours de leur exercice ou à l'occasion d'une demande d'inscription au tableau. Ce même décret a également modifié la procédure de suspension temporaire d'exercer la pharmacie en cas d'infirmité ou d'état pathologique rendant dangereux l'exercice de la profession, pour en élargir les modalités de mise en œuvre (expertise, convocation...). Il est désormais possible pour un Conseil de refuser d'inscrire un professionnel en cas de doute sérieux sur sa santé. La décision du Conseil saisi est prise dans les mêmes conditions que celles encadrant le refus d'inscription pour insuffisance professionnelle du pharmacien. La nécessité de disposer d'une procédure permettant de traiter efficacement l'insuffisance professionnelle ou l'état pathologique d'un pharmacien s'imposait à l'évidence, mais l'on peut toutefois regretter que la mise en application du décret du 26 mai s'avère si compliquée et sa lecture si ardue. Ainsi, près de 7 mois après la parution de ce texte, ces deux procédures, et notamment celle de l'insuffisance professionnelle, sont encore très peu utilisées, en partie en raison des difficultés rencontrées pour les mettre en œuvre (experts peu nombreux, voire indisponibles, incohérences entre certaines dispositions du décret...). L'Ordre a saisi récemment le ministère de la Santé à ce sujet. Par ailleurs, l'année 2014 a été marquée par la relance du contentieux des sections des assurances sociales des Conseils de l'Ordre, à la suite de la publication du décret du 26 juin 2013 relatif au fonctionnement des juridictions du contentieux du contrôle technique des professions de santé, insérant dans le Code de la Sécurité sociale de nouvelles dispositions. Parmi celles-ci, figurent la modification de la composition de ces juridictions et de leur mode de saisine, la présence de nouvelles garanties d'impartialité et la mise à disposition de nouveaux pouvoirs d'instruction. Après une paralysie de plusieurs mois, les sections des assurances sociales des Conseils de l'Ordre ont pu de nouveau se réunir de façon régulière. Le nombre de décisions rendues en première instance en 2014 a augmenté de 150 % par rapport à 2013. Une hausse similaire a été enregistrée pour les décisions d'appel, puisque la section des assurances sociales du Conseil national a rendu 10 décisions cette année, contre aucune en 2013. L'année 2014 a tout de même enregistré une baisse de 46,5 % du nombre de plaintes déposées devant les sections des assurances sociales, probablement due à cette période forcée d'inactivité, ainsi qu'a fortiori, une diminution de 29,5 % du nombre d'appels. »

#### RÉPONSES AUX QUESTIONS DU QCM (pages 84-85)

- |            |                  |
|------------|------------------|
| 1. B       | 7. A, C, D, E    |
| 2. A, C, D | 8. A, B, C, D, E |
| 3. A, C, E | 9. B             |
| 4. D       | 10. B            |
| 5. C, D    | 11. B, C, D      |
| 6. A, D, E | 12. A, B, D, E   |

de conserver la trace de toute modification de dossier en cas d'erreur (notamment la réutilisation d'un numéro de dossier déjà attribué), insuffisance des mesures mises en place pour assurer l'hygiène générale des locaux ainsi que l'hygiène et la sécurité du personnel (absence de mesures techniques de prévention et de confinement pour éviter l'exposition aux agents biologiques pathogènes classés dans les groupes 2 ou 3, non-conformité de l'utilisation des conteneurs de déchets d'activité de soins à risque infectieux, non-respect de la réglementation relative à l'enlèvement des déchets d'activité de soins à risques infectieux), non abandon de la technique à écoulement libre pour les ponctions veineuses et mauvaise gestion des non-conformités. Les juges disciplinaires ont estimé en appel que ces manquements constituaient une faute et, qu'en sa qualité de Directeur, le biologiste poursuivi devait prendre toutes les mesures qui s'imposaient pour garantir la fiabilité et la sécurité des actes réalisés dans son laboratoire. Outre ces manquements, il a été rappelé que l'intéressé avait déjà fait l'objet antérieurement d'une interdiction d'exercer pendant un mois ferme. La chambre de discipline a jugé que la persistance d'anomalies sur plusieurs années révélait des conditions dangereuses de fonctionnement du laboratoire et l'existence de risques graves encourus par les patients. Il a également été reproché au Directeur du LBM la violation d'une mesure de fermeture

administrative pour mise en conformité du laboratoire avec la réglementation, ainsi que la falsification de documents, démontrant une méconnaissance volontaire des règles régissant sa profession. L'appel a minima du plaignant a ainsi été accueilli favorablement et a donné lieu à une sanction d'interdiction définitive d'exercer la pharmacie. Le pharmacien sanctionné a formé un pourvoi en cassation devant le Conseil d'État, assorti d'une demande de sursis à exécution, qui a été rejetée par un arrêt du 4 novembre 2014.

*Pratiques déviantes du diagnostic de la maladie de Lyme - Interdiction d'exercer la pharmacie pendant 2 ans.*

Le 30 juin 2014, la chambre de discipline du Conseil national a rejeté l'appel formé par le biologiste responsable et confirmé l'interdiction d'exercer la pharmacie pendant deux ans. Il était reproché au biologiste responsable le fait d'avoir mis en œuvre de manière irrégulière le diagnostic sérologique de la maladie de Lyme due à une bactérie *Borrelia*. Ce dernier abaissait systématiquement les valeurs des seuils de positivité du test de dépistage qu'il utilisait (test Elisa commercialisé par le laboratoire Biomérieux), et ce en totale contradiction avec les préconisations du fabricant. Cette pratique le conduisait à réaliser systématiquement depuis 2011 un second test de contrôle par une technique différente (Western Blot), fac-

turé aux caisses d'assurance maladie. Les juges d'appel ont considéré que le biologiste devait travailler selon les règles de bonnes pratiques correspondant à l'activité considérée, en mettant en œuvre des méthodes scientifiques appropriées et conformes aux données actuelles de la science. Il n'appartient pas à un individu isolé de remettre en cause ces données dans sa pratique quotidienne et de faire peser sur la collectivité le poids financier d'expérimentations menées en dehors de tout cadre réglementaire et sur des fondements scientifiques, en l'espèce contestables. Ils ont également considéré que la faute était d'autant plus grave que le biologiste pratiquait le diagnostic de la maladie de Lyme sur une très large échelle, recevant des prélèvements à tester de l'ensemble du territoire français. Par sa pratique déviante, il a pu faire croire, à tort, à de très nombreux patients qu'ils étaient atteints de ladite maladie. Par ailleurs, de nombreux autres dysfonctionnements ont été relevés dans le laboratoire de biologie médicale et contestés par le biologiste, qui soutenait que la plainte se limitait aux manquements relatifs au seul diagnostic de la maladie de Lyme. La chambre de discipline du Conseil national de l'Ordre des pharmaciens a rappelé qu'elle pouvait, à l'occasion d'une plainte disciplinaire, connaître de l'ensemble du comportement du professionnel et retenir des faits autres que ceux visés dans la plainte, à la condition que le poursuivi ait été en mesure de faire valoir sa défense sur ces faits, comme c'était le cas en l'espèce, dans le respect du contradictoire.

• **Décision de la section des assurances sociales du Conseil national**

*Pratiques déviantes du diagnostic de la maladie de Lyme - Interdiction temporaire de servir des prestations aux assurés sociaux pendant 2 ans.*

Le 18 décembre 2014, la section des assurances sociales du Conseil national a jugé que les plaignants étaient fondés à demander l'aggravation de la sanction prononcée par les premiers juges. Le pharmacien biologiste responsable a été condamné à une interdiction temporaire de servir des prestations aux assurés sociaux pendant deux ans, au lieu de douze mois. Il lui était reproché plusieurs dysfonctionnements liés au diagnostic sérologique de la maladie de Lyme : abaissement systématique





du seuil de positivité du test de dépistage (test Vidas Biomérieux réalisé par méthode Elisa), interprétation non-conforme à la notice d'utilisation du fabricant (tests rendus à tort positifs ou équivoques), manquement dans la validation des résultats des examens biologiques dont l'interprétation peut être différente pour des valeurs identiques du test de dépistage, facturations non justifiées de tests de confirmation par méthode Western-Blot et recours à une lecture visuelle des bandelettes réactives du test de confirmation en lieu et place d'une lecture automatisée par un scanner dûment paramétré. Ces faits, établis par les pièces du dossier, n'ont pas été contestés par le biologiste mis en cause. La section des assurances sociales a considéré qu'un biologiste devait travailler selon les règles de bonnes pratiques correspondant à l'activité considérée, en mettant en œuvre des méthodes scientifiques appropriées et conformes aux données actuelles de la science. Il n'appartient pas à un individu isolé de remettre en cause ces données dans sa pratique quotidienne et de faire peser sur la collectivité le poids financier d'expérimentations menées en dehors de tout cadre réglementaire et sur des fondements scientifiques, en l'espèce contestables.

**Par ailleurs, le fait que ce pharmacien ait été condamné le 30 juin 2014, par la chambre de discipline du Conseil national de l'Ordre des pharmaciens, pour des faits de même nature, à une interdiction d'exercer la pharmacie pendant deux ans, est sans influence, dans la mesure où lesdits faits sont intervenus postérieurement aux faits reprochés en l'espèce.**

## • Arrêt du Conseil d'État

*Responsabilité partagée de la SELARL de biologie médicale et de son Directeur - Note en délibéré - Pourvoi rejeté.*

Par un arrêt rendu le 4 juin 2014, le Conseil d'État a statué sur le pourvoi formé par la SELARL exploitant un laboratoire de biologie médicale, contre la décision de la chambre de discipline du Conseil national de l'Ordre des pharmaciens (CNOP) du 20 mars 2012. À cette occasion, il a validé l'appréciation faite par la chambre de discipline, qui avait retenu que les nombreuses irrégularités constatées dans le laboratoire avaient révélé de graves problèmes d'organisation et non de simples erreurs



ponctuelles, dont étaient responsables non seulement le Directeur de la SELARL mais également celle-ci. La pratique de la note en délibéré devant les juridictions ordinaires a également été reconnue\*. Le Conseil d'État a tout d'abord précisé que la décision de la chambre de discipline, qui avait pris en compte les explications données par le Directeur et qui n'était tenue de répondre ni à l'ensemble des arguments de la société, ni aux développements présentés oralement devant le rapporteur concernant le règlement intérieur de la société, était suffisamment motivée sur ce point. Par la suite, la Haute Juridiction a évoqué le principe jurisprudentiel reconnaissant la possibilité de produire une note en délibéré devant toutes les juridictions administratives. Il a ainsi été rappelé qu'au plus tard le jour de l'audience, le Président de la chambre de discipline est tenu d'informer les parties que la décision sera rendue sur le siège, c'est-à-dire lue le même jour que cette audience, immédiatement après le délibéré, afin de leur permettre de produire, si elles le jugent utile, une note en délibéré. Cette obligation ayant été satisfaite en l'espèce, le moyen tiré de ce que la juridiction aurait méconnu le principe du contradictoire en omettant de procéder à cette information a été écarté. Enfin, les juges de cassation ont rappelé que la SELARL était soumise aux dispositions disciplinaires applicables aux Directeurs et Directeurs adjoints de laboratoire et que les poursuites disciplinaires contre une telle société ne pouvaient être intentées indépendamment de celles intentées contre un associé exerçant en son sein. Dès lors, le Conseil d'État a jugé que les statuts d'une SELARL et le règlement inté-

rieur qu'elle se donne pour fixer certaines modalités de fonctionnement du ou des laboratoires qu'elle exploite ne sauraient avoir pour objet ni pour effet d'exonérer la société de toute responsabilité disciplinaire. Il a ainsi estimé qu'il appartenait au juge disciplinaire, saisi d'une plainte relative au fonctionnement d'un laboratoire et dirigée à la fois contre son Directeur et contre la société d'exercice libéral qui en assure l'exploitation, de rechercher les éléments susceptibles de caractériser les responsabilités de l'un et de l'autre dans les manquements commis. En l'espèce, alors même que les statuts et le règlement intérieur de la SELARL laissaient une autonomie importante aux associés, la chambre de discipline du CNOP a pu, sans erreur de qualification juridique, estimer que les dysfonctionnements les plus graves résultaient non de la seule gestion du Directeur de la société mais également de défauts d'organisation engageant la responsabilité de la SELARL et qu'ils révélaient une faute de cette société, s'ajoutant à celles commises par le Directeur lui-même. Le pourvoi a donc été rejeté. ■

1. [www.ordre.pharmacien.fr/Nos-missions/Assurer-le-respect-des-devoirs-professionnels/Jurisprudence](http://www.ordre.pharmacien.fr/Nos-missions/Assurer-le-respect-des-devoirs-professionnels/Jurisprudence)

*\* Pour mémoire, le juge peut rouvrir les débats au vu d'une note en délibéré. Il y est tenu si cette note contient, soit l'exposé d'une circonstance de fait nouvelle et déterminante et dont la partie qui l'invoque n'a pu en faire état avant la clôture de l'instruction et que le juge ne pourrait ignorer sans fonder sa décision sur des faits matériellement inexacts, soit d'une circonstance de droit nouvelle ou que le juge devait relever d'office.*

## TEXTES JURIDIQUES

**Commission d'enrichissement de la langue française**  
(JO du 31/1/2016)

Vocabulaire de la biologie  
(liste de termes, expressions et définitions adoptés)  
Texte accessible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031942611&dateTexte=&categorieLien=id>

**LOIS (JO du 3/2/2016)**

**LOI n° 2016-87 du 2 février 2016** créant de nouveaux droits en faveur des malades et des personnes en fin de vie  
Texte accessible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031970253&dateTexte=&categorieLien=id>

**Ministère des Affaires sociales et de la Santé**  
(JO du 3/2/2016)

**Arrêté du 28 janvier 2016** relatif à la mobilisation de la réserve sanitaire dans le cadre d'une mission d'appui aux agences régionales de santé de Guadeloupe, de Martinique et de Guyane face à l'épidémie de Zika dans les départements français d'Amérique  
Texte accessible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031970619&dateTexte=&categorieLien=id>

**Arrêté du 28 janvier 2016** relatif à la mobilisation de la réserve sanitaire  
Texte accessible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031970624&dateTexte=&categorieLien=id>

**Arrêté du 1<sup>er</sup> février 2016** portant ouverture au titre de l'année universitaire 2016-2017 du concours d'internat en médecine à titre étranger pour les médecins autres que les ressortissants des États membres de l'Union européenne, d'un autre État partie à l'accord sur l'Espace économique européen, de la Principauté d'Andorre ou de la Confédération suisse  
Texte accessible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031970728&dateTexte=&categorieLien=id>

**Décision du 15 décembre 2015** portant suspension de mise sur le marché, de distribution et d'exportation des automates d'analyses mis sur le marché par la société FAMECO MEDICAL INSTRUMENTS  
Texte accessible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031970735&dateTexte=&categorieLien=id>

**Ministère des Affaires sociales et de la Santé**  
(JO du 5/2/2016)

**Arrêté du 1<sup>er</sup> février 2016** modifiant l'arrêté du 19 juillet 2001 portant organisation du concours d'internat en médecine à titre étranger  
Texte accessible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031978933&dateTexte=&categorieLien=id>

**Ministère de l'Agriculture (JO du 5/2/2016)**

**Arrêté du 4 février 2016** modifiant l'arrêté du 22 juillet 2011 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre la fièvre catarrhale du mouton sur le territoire métropolitain

Texte accessible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031979058&dateTexte=&categorieLien=id>

**Ministère de l'Agriculture (JO du 10/2/2016)**

**Arrêté du 9 février 2016** déterminant des dispositions de lutte complémentaires contre l'influenza aviaire hautement pathogène suite à la détection de la maladie sur le territoire français  
Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032000306&dateTexte=&categorieLien=id>

**LOIS (JO du 12/2/2016)**

**LOI n° 2016-138 du 11 février 2016** relative à la lutte contre le gaspillage alimentaire  
Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032036289&dateTexte=&categorieLien=id>

**Ministère de l'Agriculture (JO du 12/2/2016)**

**Arrêté du 11 février 2016** modifiant l'arrêté du 22 juillet 2011 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre la fièvre catarrhale du mouton sur le territoire métropolitain  
Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032036904&dateTexte=&categorieLien=id>

**Ministère des Affaires sociales et de la Santé**  
(JO du 12/2/2016)

**Arrêté du 2 février 2016** portant nomination et démission de membres siégeant au sein des unions régionales de professionnels de santé compétentes pour les biologistes responsables  
Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032037271&dateTexte=&categorieLien=id>

**Ministère des Affaires sociales et de la Santé**  
(JO du 13/2/2016)

**Décret n° 2016-44 du 26 janvier 2016** relatif aux sociétés exploitant un laboratoire de biologie médicale privé et aux sociétés de participations financières de profession libérale de biologistes médicaux (rectificatif)  
Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032047145&dateTexte=&categorieLien=id>

**Ministère des Affaires sociales et de la Santé**  
(JO du 14/2/2016)

**Arrêté du 6 février 2016** relatif à la mobilisation de la réserve sanitaire dans le cadre du renfort en matière d'offre de soins apporté aux ARS de Guadeloupe, de Martinique et de Guyane face à l'épidémie de Zika dans les départements français d'Amérique  
Texte accessible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032048093&dateTexte=&categorieLien=id>



## ÉCHOS PARLEMENTAIRES

### MST: s'occupe-t-on des jeunes ?

Un an après sa question au ministère de la Santé sur la prévention des maladies sexuellement transmissibles chez les plus jeunes. Michel Le Scouarnec aura reçu la réponse... Il citait en décembre 2014 une enquête de la Sécu des étudiants de la région

parisienne (SMEREP), selon laquelle 67 % des étudiants interrogés n'utiliseraient pas systématiquement de préservatif lors d'un rapport sexuel, 31 % affirmant ne jamais se protéger, 18 % rarement et 18 % souvent. Si la plupart avancent l'argument de se protéger des MST en utilisant un préservatif, ces chiffres illustrent malheureusement la faiblesse des messages de prévention, malgré des campagnes de prévention. Les messages-clés sont souvent portés par les associations... confrontées à une réduction de leur budget de fonctionnement malgré leur action d'information et de prévention vers le public. Quelles mesures sont envisagées pour développer et soutenir les actions de prévention et d'information sur les MST auprès des jeunes et des étudiants, des moyens supplémentaires seront-ils donnés aux associations œuvrant en la matière.

Réponse rassurante du ministère: des enquêtes confirment que les jeunes Français sont depuis 2001 parmi les jeunes Occidentaux utilisant le plus le préservatif: 85 % lors du dernier rapport sexuel. Toutefois, l'infection à *Chlamydia trachomatis* est l'infection sexuellement transmissible (IST) la plus fréquente chez les eux: elle touche 3,6 % des femmes de 18 à 24 ans et plus de 2,5 % des hommes de moins de 30 ans. Par ailleurs, les messages de prévention doivent être renforcés face à une certaine banalisation des risques de sida, qui pourrait en détourner certains du préservatif.

Il convient de répéter que le préservatif est la meilleure protection contre le VIH et toutes les IST. Dans ce but, en 2014 la TVA sur le préservatif a été abaissée de 7 % à 5,5 %, au lieu de l'augmentation à 10 % prévue à cette date.

L'Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (INPES) a engagé depuis 2012 une stratégie de santé sexuelle plus particulièrement ciblée sur ce public, avec l'objectif d'améliorer l'accessibilité, l'offre et la qualité en éducation à la sexualité et de promouvoir l'usage du préservatif et le dépistage des IST dans une approche globale et positive de santé sexuelle. Toutes les campagnes sur les IST ou le préservatif visent ce public. L'INPES a créé un portail internet unique en direction des jeunes: *On s'exprime*, et a innové avec une campagne de dépistage des *Chlamydiae* en ligne: *Chlamyweb* proposant un test d'autoprélèvement à domicile (cf. [www.inpes.sante.fr](http://www.inpes.sante.fr)). Cette action a rencontré une large adhésion des 18-24 ans, les résultats montrent que l'autoprélèvement à domicile quadruple le taux de dépistage vs le recours au médecin.

La DGS a des crédits pour soutenir les actions nationales d'information, de prévention et dépistage, de soutien et d'accompagnement des associations, en direction de publics prioritaires, tels les jeunes. Les actions des associations locales auprès des jeunes, présentant un intérêt régional, peuvent bénéficier d'un

financement des ARS. Des actions supplémentaires en direction des jeunes pourront être développées, avec la participation des associations aux missions IST des Centres gratuits d'information, de dépistage et de diagnostic (CeGIDD).

J.-M. M.

### Contraception d'urgence, la mal connue ?

Jean-Noël Guérini appelle l'attention du ministère de la Santé sur la contraception d'urgence, expliquant que bien qu'il existe désormais deux contraceptifs d'urgence en vente libre en pharmacie (lévonorgestrel et acétate d'ulipristal), un sondage de mars 2015 révèle que les Françaises de 15 à 50 ans se considèrent, dans leur grande majorité (65 %), mal informées sur l'utilisation de la « pilule du lendemain ». En effet, 78 % ignorent son mode d'action, 74 % son efficacité et 73 % les délais dans lesquels le contraceptif doit être pris. Pourtant, selon le Baromètre Santé 2010 par l'Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (INPES), 24 % des femmes de 15 à 49 ans ayant déjà eu des rapports sexuels ont utilisé la contraception d'urgence au moins une fois dans leur vie. En conséquence, le sénateur souhaiterait savoir comment le ministère envisage de corriger ce défaut d'information et de mieux faire connaître la contraception d'urgence aux utilisatrices potentielles.

Réponse du ministère: la contraception d'urgence permet d'éviter une grossesse non désirée lors d'une situation à risque qui peut notamment se rencontrer lorsque le moyen de contraception est déficient (accident de préservatif, oubli de pilule...). Son recours a été amélioré par l'accès libre en pharmacie, gratuit et anonyme pour les mineures. Afin de renforcer ce dispositif, le projet de loi de modernisation du système de santé prévoit que les infirmières scolaires puissent délivrer la contraception d'urgence sans aucune condition restrictive.

En 2010, 24,4 % des femmes de 15 à 49 ans déclaraient avoir utilisé au moins une fois au cours de leur vie la contraception d'urgence, alors qu'elles n'étaient que 15,2 % en 2005 et 8,9 % en 2000. Néanmoins il existe encore une méconnaissance de l'accès et de l'usage de la contraception d'urgence. Aussi depuis 2008, l'INPES a inscrit dans son programme stratégique sur la contraception l'objectif suivant: « Augmenter le recours à la contraception d'urgence en cas d'oubli, d'échec ou d'absence de contraceptif ». De plus, l'INPES va éditer de nouveaux matériels d'information, dont une brochure d'information sur la contraception d'urgence, qui existe déjà pour les départements français d'Amérique, et un outil ludo-pédagogique digital sur le site [www.choisirsacontraception.fr](http://www.choisirsacontraception.fr), pour expliquer et promouvoir le recours à la contraception d'urgence.

La Haute Autorité de santé (HAS) a mis à disposition des professionnels de santé une « fiche mémo » sur le sujet en 2013 ([www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)).

J.-M. M.



© ghoststone



© www.choisirsacontraception.fr



## SOS hôpitaux de proximité ?

Pierre Laurent (PCF, Sénat) attire l'attention du ministère de la Santé sur la situation extrêmement fragile des hôpitaux de proximité et le risque de voir se dégrader la qualité des soins. Il s'explique.

Depuis des années, des contraintes pèsent sur le fonctionnement et la vitalité des hôpitaux de proximité : des dettes, des problèmes de trésorerie, des *emprunts toxiques*, qui pénalisent de façon alarmante leur capacité de financement (Cour des comptes, avril 2014). Des problèmes d'attractivité pour le recrutement freinent le développement de l'activité et dégradent la qualité des soins, notamment dans les disciplines déficitaires en spécialistes. Ceci oblige les directions à des équilibres financiers périlleux entre une réglementation éloignée des réalités de la santé et la nécessité de la continuité des soins et la sécurité des patients.

Exemple cité : le CH de Givors, menacé de fermeture en 1995 puis en 2006, aujourd'hui en plein développement grâce à des décisions novatrices mises autour d'un nouveau projet médical d'établissement, d'un investissement total de 49 millions d'euros, soutenu financièrement par l'ARS. Malgré cette dynamique de modernisation et la hausse de l'activité, il est confronté, comme la majorité des hôpitaux de proximité, à des problèmes de trésorerie et d'attractivité. Il doit aussi faire face à la baisse de 1 %, décidée par le gouvernement, des tarifs des actes que les hôpitaux facturent à la Sécurité sociale, d'où baisse des recettes à activité constante. Alors que les hôpitaux publics ont besoin de soutien, le projet de loi de santé préconise 3 milliards d'euros d'économies, ce qui fragilisera le réseau hospitalier de proximité. Le gouvernement va-t-il soutenir les structures hospitalières publiques et l'offre de santé en régions ?

Réponse du ministère : le gouvernement s'est engagé à un *effort sans précédent* de maîtrise des finances publiques. Le ministère de la santé veut y contribuer par une maîtrise de l'ONDAM, mais affirme néanmoins ne pas vouloir fragiliser les hôpitaux de proximité. En prolongement de l'engagement n° 11 du *Pacte territoire santé*, un nouveau modèle de financement sera mis en œuvre en 2016, en cohérence avec le rôle majeur qu'ils seront appelés à jouer dans le renforcement de l'offre de premier recours. Il s'agit d'un modèle de financement mixte de façon à tenir compte de leurs spécificités et ainsi stabiliser leurs ressources.

Des travaux sont actuellement menés afin de conforter leur positionnement spécifique dans l'offre de soins, en particulier vis-à-vis des populations fragiles. Les textes d'application en

cours d'élaboration qui résulteront directement de ces travaux viendront réaffirmer ce rôle fondamental, et s'accompagneront d'un financement adapté à leurs spécificités, gage de leur pérennité et de l'indispensable adaptation de leurs prestations au service des plus fragiles.

J.-M. M.

## Quelles fibres pour remplacer l'amiante ?

L'amiante devra être remplacée, car elle a des utilités incontestables, mais par quoi ? Comme nombre de parlementaires, Annie David, sénatrice, pose la question au ministère de la Santé : ses remplaçants sont-ils sûrs ? Les fibres de substitution, telle la laine de roche, ne seraient pas sans risque. En 1988, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC, Lyon, Centre OMS), déclarait que les fibres minérales pouvaient être cancérogènes, selon 200 études internationales. En 1997, l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (OPECST) évoquait un excès de mortalité par cancer pulmonaire chez les travailleurs de la production de laines minérales et demandait des recherches pour établir un lien de causalité entre prévalence du cancer et manipulation de laines minérales. Les conclusions de l'INSERM en 1999 étaient identiques, de même en 2001 lors d'un colloque du CIRC, puis en 2008 encore avec un dossier sur les effets des fibres sur la santé : risques démontrés d'irritations, de démangeaisons, d'allergies. Quant au risque cancérogène, l'INSERM considère nécessaires des études plus poussées. Le ministère compte-t-il mener des études pour définir la dangerosité des fibres de substitution et adopter le principe de précaution pour ces produits, tant que le risque cancérogène n'est pas écarté.

Réponse du ministère : les fibres minérales artificielles, telles les fibres céramiques réfractaires (FCR), sont les principales fibres de substitution à l'amiante. Les FCR sont classées cancérogènes de catégorie 2 par la directive européenne 97/69/CE, c'est-à-dire des substances devant être assimilées à des substances cancérogènes pour l'homme. À ce titre, elles sont soumises à des restrictions de mise sur le marché (directive 2001/41/CE).





On ne peut donc les commercialiser en tant que fibres et préparations pour le public.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a été saisie le 20/7/2004 pour évaluer l'exposition de la population et des travailleurs aux fibres minérales artificielles. Dans ses conclusions (avril 2007) l'ANSES indique que l'accessibilité aux FCR et aux fibres de verre à usage spécial reste réduite pour la population générale dans des conditions normales d'usage des articles en contenant. Par ailleurs, ses travaux ont permis de préciser les produits, articles et équipements susceptibles de présenter un risque pour les travailleurs.

Le ministère du Travail a intégré plusieurs recommandations dans le Plan Santé-Travail, en priorité le remplacement de ces fibres par des matériaux moins dangereux (laines d'isolation à haute température) ou le recours à des procédés évitant de les utiliser. Car en application de l'article R. 4412-66 du Code du travail, tout agent cancérigène doit être substitué, si cela est techniquement possible, par une substance, un mélange ou un procédé qui, dans ses conditions d'emploi, n'est pas ou est moins dangereux pour la santé ou la sécurité des travailleurs.

Les FCR ont intégré le 19/5/2011 la liste, définie à l'article 59.1 du règlement européen REACH, qui identifie les substances en vue de leur inclusion éventuelle dans la liste des substances soumises à autorisation. Ainsi un fournisseur d'articles contenant des FCR doit fournir au destinataire de ces articles les informations suffisantes dont il dispose pour permettre l'utilisation dudit article en toute sécurité et comprenant au moins le nom de la substance. Le producteur ou importateur d'articles contenant des FCR doit également signaler à l'Agence européenne des produits chimiques la présence d'une substance dans ses articles.

Dans le 3<sup>e</sup> Plan Santé-Travail est prévue une action visant à améliorer la connaissance des propriétés et facteurs de toxicité des fibres dont les propriétés peuvent être similaires aux fibres d'amiante.

**J.-M. M.**

## Oncologie pédiatrique : lui donne-t-on les moyens ?

La sénatrice Stéphanie Riocreux n'est pas la première parlementaire à attirer l'attention du ministère de la Santé sur la première cause de mortalité des enfants, le cancer, avec 500 décès annuels, et à affirmer que, lorsque le diagnostic est posé, de trop nombreux parents et équipes médicales sont confrontés à une absence de traitement à tester, comme dans le cas des tumeurs du tronc cérébral. De nombreuses associations s'en émeuvent, dit-elle. Elle demande quelles mesures sont prévues pour garantir un financement pérenne de la recherche afin de prévenir et de guérir ces formes de cancers pédiatriques particulièrement fatales.

Réponses du Ministère : chaque année en France, on diagnostique près de 2 500 nouveaux cas de cancers pédiatriques (1 700) et adolescents (700), le taux de survie des enfants est passé de 25 % à 80 % en 30 ans. La prise en charge des cancers de l'enfant s'effectue en centres de cancérologie pédiatrique disposant d'un environnement intégrant les dimensions familiale, psychologique, sociale et scolaire spécifiques aux enfants.



© bnmk0819

Des actions de santé publique sont en cours avec deux registres nationaux des cancers de l'enfant : un sur les hémopathies malignes (RNHE), l'autre sur les tumeurs solides de l'enfant (RNTSE). Une plateforme d'observation des cancers de l'enfant, au sein du RNHE à Villejuif, permet d'améliorer les connaissances épidémiologiques des cancers de l'enfant et de l'adolescent en lien avec la biologie. Des actions de l'Institut national du cancer (INCa) et de l'Institut thématique multi-organismes cancer (ITMO-Cancer) ont été développées en biologie, facteurs de risque, sciences humaines et sociales, épidémiologie, santé publique et facteurs environnementaux et génétiques liés aux cancers.

Quarante essais cliniques sont actuellement ouverts aux inclusions d'enfants atteints de cancer, dont 11 essais pour les cancers cérébraux de l'enfant, bénéficiant d'un financement significatif. Ainsi, entre 2007 et 2011, leur financement a été de 38 millions d'euros sur un budget estimé au total de 350 millions d'euros, soit près de 10 % du financement de la recherche sur le cancer. Des recherches multidisciplinaires rapprochant immunologie et la biologie des cancers permettent de développer une approche intégrée en immunothérapie.

Des associations de parents se sont par ailleurs investies dans le soutien à la recherche, dans l'amélioration de la qualité des soins, de la prise en charge des jeunes patients et de l'accompagnement de leurs familles. Un guide d'information « *Mon enfant a un cancer* » publié en 2009 a été actualisé en 2014 par l'INCa ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)).

Le Plan Cancer prévoit d'identifier et labelliser des centres de référence au niveau national pour la prise en charge des enfants présentant des tumeurs rares. Il s'agit de mettre en place une organisation nationale, reposant sur des centres de référence labellisés INCa, pour assurer une thérapeutique adaptée dans des équipes spécialisées en cancérologie des enfants, en cas de cancers très rares ou de recours à des techniques très spécialisées. Des partenariats avec l'industrie pharmaceutique seront développés pour accélérer la prise en compte des cancers rares et des cancers pédiatriques. Pour l'accès aux médicaments innovants, le Plan encourage une politique de priorités du développement de médicaments, prenant en compte la cancérologie pédiatrique. ■■

**Jean-Marie Manus**